



Universidad de Oviedo



UNIVERSIDAD NACIONAL  
DEL NORDESTE

Doctorado en Ingeniería Química, Ambiental y Bioalimentaria -Universidad de Oviedo - España.

Doctorado de la UNNE en Química -Universidad Nacional del Nordeste - Argentina.

**EN REGIMEN DE COTUTELA**

# **Selección y caracterización molecular de BAL productoras de GABA para la elaboración de productos lácteos funcionales**

**Directores**

**Dr. Baltasar Mayo Pérez**

**Dra. Olga Myriam Vasek**

**Dra. Ana Belén Flórez García**

**José Alejandro Valenzuela López**

**Tesis Doctoral**

**2025**



La investigación plasmada en esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de productos lácteos de Asturias IPLA-CSIC y en el Instituto de Modelado e Innovación tecnológica IMIT-CONICET.



INSTITUTO DE  
PRODUCTOS LÁCTEOS  
DE ASTURIAS



I M I T



## **Agradecimientos**

Me gustaría manifestar mi profunda gratitud a los Doctores Baltasar Mayo Pérez, Olga M. Vasek y Ana Belén Flórez, cuya dirección ha sido fundamental para la realización de este trabajo. Aprecio enormemente su continuo apoyo y valiosos consejos. Este trabajo no hubiera sido posible sin el soporte constante de Ustedes.

Al Dr. Gustavo Aucar, Director del Instituto de Modelado e Innovación tecnológica CONICET-UNNE, por brindarme esta oportunidad.

Al CONICET y a la Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado (AUIP) por las becas de investigación que permitieron financiar parte de los viajes para llevar adelante esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento a todos mis compañeros de trabajo del Instituto por la buena predisposición y colaboración para realizar este trabajo; y en particular a mis compañeros de laboratorio Lucia, Javi, Eva, Cristina y Mario, con los que he tenido el placer de coincidir a lo largo de estos años, que de una u otra forma han hecho de estos años una experiencia hermosa. A todos los integrantes del IPLA Sport por hacer de las estancias no solo una experiencia de investigación, sino también un lugar de esparcimiento, disfrute y compartir buenos momentos. Gracias por hacerme sentir en casa.

A mi familia y amigos. A mis padres y hermanos, gracias por su amor y apoyo constante. A mis amigos por sus palabras de aliento en el momento justo.

A vos Natalia, mi compañera y cómplice de vida, gracias por tu compañía, apoyo y amor de siempre.



# Índice





## ÍNDICE

|   |             |
|---|-------------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS</b>  | <b>I</b>    |
| <b>LISTA DE FIGURAS Y TABLAS</b>  | <b>III</b>  |
| <b>Resumen</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>Summary</b>  | <b>X</b>    |
| <b>1. Introducción</b>  | <b>1</b>    |
| <b>1.1 Microbiota de la leche y los productos lácteos</b>                                 | <b>2</b>    |
| 1.1.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)   | <b>3</b>    |
| 1.1.2. Otros tipos bacterianos  | <b>7</b>    |
| 1.1.3. Mohos y levaduras  | <b>7</b>    |
| 1.1.4. Cultivos iniciadores y de maduración   | <b>8</b>    |
| <b>1.2 Rol de los fermentos en los productos lácteos</b>                                  | <b>8</b>    |
| 1.2.1. Bioquímica de las fermentaciones lácteas   | <b>9</b>    |
| 1.2.2. Aumento de la vida útil y mejora de la seguridad alimentaria                       | <b>12</b>   |
| 1.2.3. Alimentos funcionales  | <b>13</b>   |
| 1.2.4. Elaboración de productos lácteos funcionales y producción de sustancias bioactivas | <b>13</b>   |
| <b>1.3. El ácido gamma aminobutírico (GABA)</b>   | <b>15</b>   |
| 1.3.1. Fisiología del GABA  | <b>15</b>   |
| 1.3.2. Productos lácteos fermentados enriquecidos en GABA                                 | <b>16</b>   |
| 1.3.3. BAL productoras de GABA  | <b>17</b>   |
| <b>1.4. Bioquímica y genética de la producción de GABA por BAL</b>                        | <b>18</b>   |
| 1.4.1. La enzima glutámico descarboxilasa (GAD)   | <b>18</b>   |
| 1.4.2. El operón de GABA  | <b>18</b>   |
| 1.4.3. Regulación de la producción de GABA por BAL  | <b>19</b>   |
| <b>2. Contexto y objetivos</b>  | <b>20</b>   |
| <b>3. Materiales y métodos</b>  | <b>24</b>   |
| <b>3.1. Microorganismos, medios y condiciones de cultivo</b>                              | <b>25</b>   |
| <b>3.2. Mediciones de pH, densidad bacteriana y viabilidad</b>                            | <b>26</b>   |
| <b>3.3. Detección y cuantificación de GABA</b>  | <b>26</b>   |
| 3.3.1. Método enzimático de detección con GABasa  | <b>26</b>   |
| 3.3.2. Método de cuantificación por cromatografía líquida (UHPLC)                         | <b>26</b>   |
| <b>3.4. Análisis molecular de los aislados bacterianos</b>                                | <b>27</b>   |
| 3.4.1. Extracción y purificación de ADN   | <b>27</b>   |
| 3.4.2. Identificación de especies mediante secuenciación del gen 16S ARNr                 | <b>28</b>   |
| 3.4.3. Detección y secuenciación de genes <i>gad</i>                                      | <b>28</b>   |
| 3.4.4. Tipificación molecular de los aislados bacterianos (RAPD y rep-PCR)                | <b>29</b>   |
| <b>3.5. Evaluación de la seguridad de las cepas productoras de GABA</b>                   | <b>29</b>   |
| 3.5.1. Producción de aminas biógenas  | <b>29</b>   |
| 3.5.2. Resistencia a antibióticos   | <b>29</b>   |
| <b>3.6. Caracterización tecnológica y bioquímica de las cepas productoras de GABA</b>     | <b>30</b>   |
| 3.6.1. Fermentación de carbohidratos  | <b>30</b>   |
| 3.6.2. Actividad enzimática   | <b>30</b>   |
| 3.6.3. Actividad ureasa   | <b>31</b>   |

|   |     |
|---|-----|
| 3.6.4. Producción de bacteriocinas  | 31  |
| 3.6.5. Crecimiento en leche y producción de ácidos orgánicos, azúcares y volátiles (COV)                      | 31  |
| 3.6.6. Producción de GABA en leches y heces   | 32  |
| <b>3.7. Secuenciación y análisis genómico de cepas productoras de GABA</b>                                    | 33  |
| 3.7.1. Secuenciación y análisis genómico  | 33  |
| 3.7.2. Identificación genómica  | 33  |
| <b>3.8. Efecto de distintos parámetros tecnológicos en la producción de GABA</b>                              | 33  |
| 3.8.1. Tiempos de incubación-cinética de crecimiento  | 34  |
| 3.8.2. Influencia del pH, la temperatura y las concentraciones de azúcares, NaCl y glutamato monosódico (GMS) | 34  |
| <b>3.9. Empleo de cultivos productores de GABA en la elaboración de productos lácteos</b>                     | 35  |
| 3.9.1. Elaboración de leche fermentada  | 35  |
| 3.9.2. Elaboración de yogur   | 36  |
| 3.9.3. Evaluación sensorial   | 37  |
| <b>3.10. Análisis transcripcional del operón GAD de <i>S. thermophilus</i> St 8.1</b>                         | 37  |
| 3.10.1. Condiciones de cultivo bacteriano   | 37  |
| 3.10.2. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNC   | 37  |
| 3.10.3. Cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR  | 38  |
| <b>4. Resultados y discusión</b>  | 40  |
| <b>Capítulo 1.- Identificación y selección de cepas de bacterias lácticas productoras de GABA</b>             | 41  |
| <b>4.1. Evaluación de la capacidad de producir GABA en aislados de BAL</b>                                    | 41  |
| 4.1.1. BAL aisladas de muestras de quesos y productos lácteos fermentados.                                    | 41  |
| 4.1.2. BAL aisladas de muestras de leche cruda  | 47  |
| <b>4.2. Tipificación de los aislados de BAL con mayor producción de GABA</b>                                  | 49  |
| <b>Capítulo 2.- Caracterización fenotípica y genómica de cepas de BAL productoras de GABA</b>                 | 52  |
| <b>4.3. Caracterización bioquímica y tecnológica de las cepas seleccionadas</b>                               | 52  |
| 4.3.1. Utilización de carbohidratos, lípidos, proteínas y aminoácidos   | 52  |
| 4.3.2. Crecimiento en leche y producción de compuestos de interés tecnológico                                 | 57  |
| 4.3.3. Capacidad para sintetizar péptidos antimicrobianos   | 59  |
| 4.3.4. Producción de GABA en leche suplementada con GMS   | 60  |
| 4.3.5. Producción de GABA en homogeneizados fecales   | 61  |
| <b>4.4. Evaluación de la seguridad biológica de las cepas seleccionadas</b>                                   | 61  |
| 4.4.1. Producción de aminas biogénas  | 61  |
| 4.4.2. Perfiles de sensibilidad-resistencia a antibióticos  | 62  |
| <b>4.5. Caracterización molecular de las cepas seleccionadas</b>  | 64  |
| <b>Capítulo 3.- Elaboración de productos lácteos fermentados enriquecidos en GABA</b>                         | 75  |
| <b>4.6. Elaboración de productos lácteos funcionales</b>  | 75  |
| <b>4.7. Análisis sensorial</b>  | 77  |
| <b>Capítulo 4.- Caracterización y control de la producción de GABA en <i>S. thermophilus</i> St 8.1</b>       | 81  |
| <b>4.8. Dinámica de crecimiento, evolución del pH y producción de GABA</b>                                    | 81  |
| <b>4.9. Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de GABA</b>                                     | 85  |
| <b>4.10. Regulación transcripcional de los genes gad</b>  | 88  |
| <b>5. Discusión general</b>   | 93  |
| <b>5.1. El GABA y los productos lácteos funcionales</b>   | 94  |
| <b>5.2. <i>L. lactis</i> y <i>S. thermophilus</i> como fermentos</b>  | 96  |
| <b>5.3. El GABA en la fisiología celular de las BAL</b>   | 98  |
| <b>5.4 Limitaciones del trabajo y proyecciones a futuro</b>   | 100 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>6. Conclusiones</b>   | <b>102</b> |
| <b>7. Referencias</b>  | <b>104</b> |
| <b>8. ANEXOS</b>   | <b>126</b> |
| ANEXO I. Microorganismos y condiciones de cultivo  | 127        |
| ANEXO II. Composición de los medios de cultivo y las soluciones empleadas                | 129        |
| ANEXO III. Datos de concentración de GABA producidas por los aislados y cepas en estudio | 134        |
| ANEXO IV. Características de las cepas productoras de GABA                               | 145        |
| ANEXO V. Elaboración de productos lácteos  | 156        |



## LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

|  |   |
|--|---|
| <: menor que   | HS: espacio de cabeza- <i>Head Space</i>  |
| >: mayor que   | IS: estándar interno - <i>Internal Standard</i>   |
| <b>AB:</b> Aminas biógenas   | <b>Kpb:</b> kilo pares de bases   |
| <b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico  | L: litro  |
| <b>ARN:</b> Ácido ribonucleico   | <i>L.</i> : <i>Lactococcus</i>  |
| <b>ARNm:</b> Ácido ribonucleico mensajero  | <i>Lb.</i> : <i>Lactobacillus</i>   |
| <b>ARNr:</b> Ácido ribonucleico ribosomal  | <i>Lcb.</i> : <i>Lacticaseibacillus</i>   |
| <b>ARNr:</b> Ácido ribonucleico de transferencia   | <i>Lvb.</i> : <i>Levilactobacillus</i>  |
| <b>ATTC:</b> Colección Americana de Cultivos Tipo - <i>American Type Culture Collection</i>  | <i>Lpb.</i> : <i>Lactiplantibacillus</i>  |
| <b>BAL:</b> Bacterias ácido lácticas   | <i>Ln.</i> : <i>Leuconostoc</i>   |
| <b>CIM:</b> Concentración inhibitoria mínima   | log: logaritmo  |
| <b>Cóntigo/s - Contig/s:</b> conjunto de segmentos o secuencias de ADN que se superponen parcialmente y juntos representan una secuencia de ADN consenso | mg: miligramos  |
| <b>COV:</b> compuestos orgánicos volátiles   | mL: mililitro   |
| <b>Ct:</b> ciclo umbral en qPCR - <i>Cycle threshold</i>   | <b>NADP+:</b> dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (coenzima)                               |
| <b>DO:</b> densidad óptica   | <b>NADPH:</b> forma reducida de la coenzima NADP+   |
| <b>EFSA:</b> Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria - <i>European Food Safety Authority</i>  | <b>NOAEL:</b> nivel sin efectos adversos observados - <i>No Observed Adverse Effect Level</i>         |
| <b>FDA:</b> Agencia Americana de Medicamentos y Alimentación - <i>Food and Drug Administration</i>   | <b>No.:</b> número  |
| <b>g:</b> gramo  | Ø: diámetro   |
| <b>GAD:</b> glutamato descarboxilasa   | <b>ORF:</b> marco abierto de lectura - <i>Open Reading Frame</i>                                      |
| <b>GABA:</b> Ácido gamma-aminobutírico - <i>Gamma-aminobutyric acid</i>  | <b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa - <i>Polymerase Chain Reaction</i>                    |
| <b>GABasa:</b> mezcla de las enzimas γ-aminobutirato glutamato aminotransferasa y succinato semialdehído deshidrogenasa                                  | <b>pH:</b> logaritmo negativo de la concentración de protones   |
| <b>GC:</b> cromatografía gaseosa - <i>Gas Chromatography</i>   | <b>PTFE:</b> politetrafluoroetileno   |
| <b>GMS:</b> glutamato monosódico   | <b>qPCR:</b> PCR cuantitativa o PCR en tiempo real - <i>Quantitative polymerase chain reaction</i>    |
| <b>HPLC:</b> cromatografía líquida de alta resolución - <i>High Performance Liquid Chromatography</i>  | <b>RT-PCR:</b> PCR con transcriptasa inversa - <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> |

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa con transcriptasa inversa - *Quantitative reverse transcription PCR*

**s:** segundos

**SPME:** microextracción en fase sólida - *Solid Phase Microextraction*

**T<sub>m</sub>:** temperatura de fusión - *Melting temperature*

**U:** unidades

**ufc:** unidades formadoras de colonia

**UHPLC:** cromatografía líquida de ultra-alta resolución - *Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography*

**UHT:** ultra pasteurizada - *Ultra High Temperature*

**uma:** unidad de masa atómica

**UV:** ultravioleta

**μg:** microgramo

**μL:** microlitro

**nM:** nanomolar

**mM:** milimolar

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

| <b>Figura</b> | <b>Título</b>   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| Figura 1      | Fuentes potenciales de microorganismos presentes en la leche cruda y los productos lácteos. Adaptado de Quigley et al. (2013).  | 3             |
| Figura 2      | Metabolismo de la lactosa en las bacterias ácido-lácticas.  | 9             |
| Figura 3      | Reacción de descarboxilación del ácido glutámico para la producción de GABA mediante la enzima glutamato descarboxilasa GAD.  | 15            |
| Figura 4      | Producción de GABA por bacterias ácido-lácticas (BAL) a partir de la descarboxilación del ácido glutámico introducido en la célula bacteriana por el antiportador (codificado por el gen <i>gadC</i> ) y transformado por la acción de la enzima glutamato descarboxilasa (codificada por el gen <i>gadB</i> ). Adaptado de Cotter & Hill (2003).   | 17            |
| Figura 5      | Estructura de los derivados de aminoenona: a) reacción de derivatización, b) derivado de aminoácido primario y c) derivado de aminoácido secundario (Gómez-Alonso et al., 2007).  | 27            |
| Figura 6      | Preparación del inóculo y elaboración del producto lácteo.  | 35            |
| Figura 7      | Concentración de GABA (mM) producido por cepas bacterianas en medio líquido adicionado con glutamato monosódico (1% p/v; $\approx$ 100 mM).   | 42            |
| Figura 8      | Árbol filogenético basado en las secuencias de un segmento interno (1.238 pb de largo) de los diferentes genes que codifican la enzima glutamato descarboxilasa de las cepas de <i>Lactococcus lactis</i> analizadas en este estudio. La secuencia de <i>Lactococcus cremoris</i> MG 1363 (n.º de acceso de GenBank AM406671.1; etiqueta de locus llmg_1179) se utilizó como comparador. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones por secuencia. | 45            |
| Figura 9      | Ánalisis genómico del loci del operón GAD involucrado en la síntesis del GABA en (A) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LL441 (n.º de acceso de GenBank LWKN00000000) y (B) <i>Streptococcus thermophilus</i> St-10 (n.º de acceso de GenBank PHHG00000000), incluido el gen GAD ( <i>gadB</i> ) y su antiportador de glutamato/gamma-aminobutirato asociado ( <i>gadC</i> ).   | 47            |
| Figura 10     | Perfiles de tipificación mediante RAPD y rep-PCR de cepas de <i>Lactococcus lactis</i> (A, B, C) y <i>Streptococcus thermophilus</i> (E, F, G) obtenidos con los cebadores M13 (A, E), BoxA2R (B, F) y OPA18 (C, G), y dendrograma de similitud (D, H) de los perfiles de tipificación combinados expresados por el coeficiente de similitud de Jaccard (en %). La agrupación se realizó mediante el método de grupos de pares no ponderados utilizando                     | 49            |

promedios aritméticos (UPGMA). La línea roja marca la repetibilidad del método (93%). En negrita, cepas sometidas a secuenciación genómica.

Figura 11 pH (A) y producción de GABA (B) por cepas de *Lactococcus lactis* (32°C) y *Streptococcus thermophilus* (42°C) en leche semidescremada suplementada con 10 mM de glutamato monosódico. 57

Figura 12 Ensayo de difusión en agar para determinar la producción de bacteriocinas en *Lactococcus lactis* Lc 16.6 y *Streptococcus thermophilus* St 8.1. A-sobrenadante; B-sobrenadante neutralizado con NaOH 0,1N; C, D, F, G y H diluciones 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32 y 1/64 respectivamente; I y J sobrenadante y sobrenadante neutralizado con NaOH 0,1N de control positivo (+): cultivo de *Lactiplantibacillus plantarum* LL441 respectivamente. Se utilizó como cepa indicadora *Latilactobacillus sakei* CECT 906<sup>T</sup> sembrada en el césped. 60

Figura 13 Organización genética de los operones GABA encontrados en el genoma de las cepas de *Lactococcus lactis* (A) y *Streptococcus thermophilus* (B). Código de color: en rojo, genes que codifican a la enzima glutamato descarboxilasa (*gadB*); en verde, genes que codifican los antiportadores GABA/H<sup>+</sup> (*gadC*), en morado, genes que codifican para la proteína reguladora (*gadR*); en amarillo, genes que codifican para transposasas; en blanco, genes que codifican proteínas de otros sistemas o ORFs que codifican proteínas hipotéticas. Se encontró que el operón GABA de *Lactococcus lactis* Lc 14.1 se extendía en cuatro cíntigos diferentes. Las líneas punteadas indican que los cíntigos se extienden más allá del área representada. 67

Figura 14 Organización genética de los operones lactosa/galactosa encontrados en los genomas de las cepas de *Lactococcus lactis* (A) y *Streptococcus thermophilus* (B). Código de color: en rojo, genes que codifican a la β-galactosidasa (*lacZ*) o la fosfo-β-galactosidasa (*lacG*); en verde, genes implicados en el transporte (*lacFE*, componentes de PEP-PTS; *galP*, permeasa de galactosa; *lacS*, permeasa de lactosa/galactosa); en morado, genes que codifican proteínas reguladoras (*lacR*, *galR*); en celeste, otros genes del metabolismo del azúcar (*lacAB*, galactosa isomerasa; *lacC*, tagatosa-6-fosfato quinasa; *lacD*, tagatosa-1,6-fosfato aldolasa; *galE*, UDP-glucosa-4-epimerasa; *galK*, galactoquinasa; *galM*, aldosa-1-epimerasa; *galT*, Galactosa-1-fosfato uridiltransferasa; *lacA*, galactósido acetiltransferasa); en amarillo, genes parciales que codifican transposasas; en blanco, genes que codifican proteínas de otros sistemas o ORFs que codifican proteínas hipotéticas. Las líneas punteadas indican que el cíntigo se extiende más allá del área representada. 69

Figura 15 Organización genética de los grupos de genes de citrato encontrados en el genoma de *Lactococcus lactis*, Lc 14.4 (A) y Lc 21.1 (B). Código de color: en celeste, genes del operón citrato liasa (*citM-citCDEFXG*) y de la enzima maloláctica (*mleA*); en verde, genes implicados en el transporte, incluyendo la permeasa de citrato (*citP*) y dos simportadores de malato-citrato/H<sup>+</sup>; en púrpura, genes que codifican proteínas reguladoras; en 70

amarillo, genes que codifican proteínas de movilización; en blanco, otros genes o genes que codifican proteínas hipotéticas. Los recuadros indican repeticiones de ADN (marrón) o genes parciales N-terminales (blanco). Los asteriscos marcan mutaciones que alteran la pauta los ORFs. Las líneas discontinuas indican que los cóntigos se extienden más allá de estas posiciones.

- Figura 16 Organización genética del operón de la ureasa en el genoma de cepas de *Streptococcus thermophilus*. Código de color: en rojo, genes catalíticos de la ureasa (*ureA*, *ureB* y *ureC*); en celeste, genes accesorios; en blanco, genes que codifican proteínas hipotéticas o proteínas de otros sistemas. Las líneas punteadas indican que el cóntigo se extiende más allá del área representada. Los asteriscos marcan mutaciones que alteran los ORF. 71
- Figura 17 Producción de GABA a partir de GMS durante la elaboración y vida de estante a 4°C de productos lácteos: (A) leche fermentada y (B) yogur. S1, S2 y S4: semanas 1, 2 y 4 respectivamente. La línea punteada separa horas de semanas. 76
- Figura 18 Análisis sensorial de yogur elaborado con BAL seleccionadas, utilizando una escala hedónica de 5 puntos y codificación de 3 dígitos. (A) Atributos de: sabor, aspecto, aroma y textura, (B) Aceptación global. Codificación: 238 y 549, yogur elaborado con BAL productoras de GABA sin y con el agregado de 10mM GMS, respectivamente; 664, yogur elaborado con fermento comercial sin el agregado de GMS. 78
- Figura 19 Dinámica de crecimiento, evolución del pH y producción de GABA a lo largo del tiempo por *Streptococcus thermophilus* St 8.1: (A) en medio LM17 y (B) en medio LM17 suplementado con 5 mM de GMS. 82
- Figura 20 Dinámica de crecimiento, evolución del pH y producción de GABA a lo largo del tiempo por *Streptococcus thermophilus* St 8.1: (A) en medio CDM y (B) en medio CDM suplementado con 10 mM de GMS. 84
- Figura 21 Efecto de diferentes condiciones sobre la producción de GABA por *Streptococcus thermophilus* St 8.1. La condición de cultivo control fue caldo M17 suplementado con 1% de lactosa y 10 mM de GMS, y una temperatura de incubación de 42°C. Las barras indican la concentración de GABA y los puntos indican el pH. 86
- Figura 22 Producción de GABA, crecimiento celular y variación del pH de *Streptococcus thermophilus* St 8.1 en caldo M17 suplementado con 1% de lactosa y 10 mM de GMS a un pH inicial ajustado a 7,0; 6,5 y pH 5,5. 87
- Figura 23 Producción de GABA y evolución del pH en los cultivos de *Streptococcus thermophilus* St 8.1 en diferentes condiciones: C1, CDM; C2, CDM<sub>GMS</sub>; C3, CDM<sub>GMS</sub> suplementado con 1% NaCl y C4, CDM<sub>GMS</sub> suplementado con 2% lactosa. 88

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 24 | Expresión de los genes <i>gadB</i> (A) y <i>gadC</i> (B) de <i>Streptococcus thermophilus</i> St 8.1 mediante RT-qPCR y cuantificación del efecto de NaCl al 1% y lactosa al 2%. Las barras muestran la expresión relativa de los genes después de la normalización con el gen de mantenimiento de la subunidad β de la glicina-ARnt ligasa ( <i>glyS</i> ) y con la expresión en la condición de referencia (CDM sin GMS; C1). Las líneas indican la evolución del pH en los cultivos.    | 89 |
| Figura 25 | Expresión de los genes <i>gadB</i> (A) y <i>gadC</i> (B) de <i>Streptococcus thermophilus</i> St 8.1 mediante RT-qPCR y cuantificación del efecto de NaCl al 1% y lactosa al 2%. Las barras muestran la expresión relativa de los genes después de la normalización con el gen de mantenimiento de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa ( <i>GADPH</i> ) y con la expresión en la condición de referencia (CDM sin GMS; C1). Las líneas indican la evolución del pH en los cultivos. | 90 |

---

| Tabla   | Título  | Página |
|---------|---|--------|
| Tabla 1 | Eficiencia de amplificación de los cebadores para GABA y genes de mantenimiento en este estudio y ecuaciones de regresión para el análisis RT-qPCR.                                   | 38     |
| Tabla 2 | Cepas seleccionadas que presentan mayor producción de GABA en medio de cultivo con GMS como precursor.  | 43     |
| Tabla 3 | Producción de GABA (mM) de aislados de leche cruda en medio de cultivo adicionado del precursor GMS 10 mM.  | 48     |
| Tabla 4 | Perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> productoras de GABA.  | 53     |
| Tabla 5 | Actividades enzimáticas de cepas de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> productoras de GABA mediante el sistema API-ZYM.                                    | 55     |
| Tabla 6 | Perfil de azúcares y ácidos orgánicos de las cepas productoras de GABA <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> después del crecimiento en leche semidescremada. | 56     |
| Tabla 7 | Cantidades relativas de compuestos volátiles producidos en leche semidescremada por las cepas de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> .                      | 58     |
| Tabla 8 | Producción de aminas biogénas (mM) por aislados de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> .  | 62     |
| Tabla 9 | Concentración inhibitoria mínima (CIM) de 16 antibióticos para <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> productores de GABA.                                     | 63     |





# Resumen *Summary*





## Resumen

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido no proteico con un rol destacado en distintas funciones fisiológicas y muy extendido en la naturaleza en plantas y animales. Se cree que, en el hombre, el GABA tiene efectos beneficiosos sobre la salud y el bienestar. En el sistema nervioso central actúa como el mayor inhibidor del impulso neurotransmisor con funciones calmantes y relajantes. Además, el GABA tiene efectos hipotensores, diuréticos y antidiabéticos. Muchos microorganismos pueden producir GABA a partir del ácido glutámico, incluyendo diversas bacterias del ácido láctico (BAL). La producción de GABA por BAL podría utilizarse en el desarrollo de alimentos fermentados funcionales. En este estudio, inicialmente se analizó la capacidad de producción de GABA por cepas acido lácticas aisladas de leche cruda y productos lácteos tradicionales elaborados con leche cruda sin cultivos iniciadores. Este ensayo se llevó a cabo en medios de cultivo suplementados con glutamato monosódico (GMS) al 1% utilizando un método enzimático (GABasa). Entre las cepas que resultaron productoras en este ensayo, el estudio se centró en las especies *Lactococcus (L.) lactis* y *Streptococcus (S.) thermophilus* que produjeron  $>1$  mM de GABA. La producción de GABA se confirmó mediante cultivos adicionados del precursor, GMS, seguida de cuantificación por cromatografía líquida HPLC. Utilizando cebadores específicos de especie, el gen que codifica la glutamato descarboxilasa (*gadB*) se amplificó por PCR en los productores de GABA analizados. Las secuencias de amplicones se compararon entre sí y con las contenidas en bases de datos. Posteriormente, se seleccionó un grupo de cepas productoras de GABA, y se determinaron sus perfiles fenotípicos, tecnológicos y de seguridad alimentaria. En cuatro cepas de cada especie se realizó el análisis del genoma, el cual proporcionó la base genética de la mayoría de las propiedades fenotípicas analizadas. El operón que alberga el gen *gadB* está codificado en el cromosoma en todas las cepas y mostró el mismo contenido génico y el mismo orden de genes que los reportados, respectivamente, para *L. lactis* y *S. thermophilus*. En esta última especie, el operón está flanqueado (como en la mayoría de las cepas de esta especie) por copias completas o truncadas de secuencias de inserción, lo que sugiere una adquisición mediante transferencia horizontal de genes. Los genomas de tres cepas de *L. lactis* y dos de *S. thermophilus* mostraron un gen que codifica una proteinasa caseinolítica (*PrtP* en *L. lactis* y *PrtS* en *S. thermophilus*). Estas cepas se crecieron en leche formando un coágulo de buena apariencia y un atractivo sabor ácido. También produjeron GABA a partir de GMS en este medio. Se identificaron dos cepas de *L. lactis* pertenecientes a la biovar. *diacetylactis*; estas utilizan el citrato de la leche y producen cantidades significativas de acetona. Ninguna de las cepas mostró resistencia adquirida a los antibióticos ensayados, ni sus genomas albergaban genes de resistencia transferibles, tampoco genes implicados en toxicidad, virulencia o patogenicidad. En conjunto, los resultados sugerían que las ocho cepas seleccionadas pueden considerarse candidatas para su uso como cultivos iniciadores o adjuntos para

la fabricación de productos lácteos fermentados enriquecidos en GABA. Su utilidad real como fermentos se comprobó mediante elaboraciones experimentales de leche fermentada (las cuatro cepas de *L. lactis*) y de yogur (las cepas de *S. thermophilus* en combinación con una cepa de *Lactobacillus delbrueckii*) a partir de leche adicionada de GMS. Sin embargo, para un uso racional de estos cultivos funcionales, es necesario conocer los mecanismos involucrados en la síntesis y regulación de GABA. Por ello, finalmente, se llevó a cabo un análisis transcripcional de los genes *gadB* y *gadC* en la cepa *S. thermophilus* St 8.1 en condiciones que simulan las de fabricación y maduración de productos lácteos fermentados. Mediante PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR), se observó que para la activación del operón GAD se requiere un pH inferior a 5,0. Además, la expresión de los genes *gad* se ve afectada de manera diferente por señales específicas del entorno: aumenta en presencia de NaCl y disminuye en presencia de lactosa.

## Summary

$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid with a prominent role in various physiological functions. It is widespread in nature, found in both plants and animals. In humans, GABA is believed to have beneficial effects on health and well-being. In the central nervous system, GABA acts as the major neurotransmitter impulse inhibitor, providing calming and relaxing functions. Additionally, GABA exhibits hypotensive, diuretic, and antidiabetic effects. Many microorganisms can produce GABA from glutamic acid, including various lactic acid bacteria (LAB). GABA production by LAB can be used in developing functional fermented foods. In this study, we initially analyzed the GABA production capacity of lactic acid strains isolated from raw milk and traditional dairy products made from raw milk without starter cultures. This assay was conducted in culture media supplemented with 1% monosodium glutamate (MSG) using an enzymatic method (GABase). Among the strains that produced GABA in this assay, the study focused on strains of the species *Lactococcus (L.) lactis* and *Streptococcus (S.) thermophilus* that produced >1 mM of GABA. GABA production was confirmed through cultures with the precursor MSG, followed by quantification via liquid chromatography HPLC. Using species-specific primers, the gene encoding glutamate decarboxylase (*gadB*) was amplified by PCR in the analyzed GABA producers. Amplicon sequences were compared with each other and with those contained in databases. Subsequently, a group of GABA-producing strains was selected, and their phenotypic, technological, and food safety profiles were determined. The genome analysis of four strains of each species provided the genetic basis for most of the phenotypic properties analyzed. The operon harboring the *gadB* gene is encoded in the chromosome in all strains and showed the same gene content and gene order as reported for *L. lactis* and *S. thermophilus*. In the latter species, the operon is flanked (as in most strains of this species) by complete or truncated copies of insertion sequences, suggesting acquisition through horizontal gene transfer. The genomes of three *L. lactis* strains and two *S. thermophilus* strains showed a gene encoding a caseinolytic proteinase (*PrtP* in *L. lactis* and *PrtS* in *S. thermophilus*). These strains grew in milk, forming a well-appearing coagulum and an attractive acidic flavor. They also produced GABA from MSG in this medium. Two *L. lactis* strains belonging to the *diacetylactis* biovar were identified; these utilize milk citrate and produce significant amounts of acetoin. None of the strains showed acquired resistance to the tested antibiotics, nor did their genomes harbor transferable resistance genes, or genes involved in toxicity, virulence, or pathogenicity. Overall, the results suggested that the eight selected strains can be considered candidates for use as starter or adjunct cultures for the production of GABA-enriched fermented dairy products. Their actual usefulness as fermentations was tested through experimental preparations of fermented milk (the four *L. lactis* strains) and yogurt (the *S. thermophilus* strains in combination with a *Lactobacillus delbrueckii* strain) from milk supplemented with MSG. However, for

the rational use of these functional cultures, it is necessary to understand the mechanisms involved in GABA synthesis and regulation. Therefore, a transcriptional analysis of the *gadB* and *gadC* genes was carried out in the *S. thermophilus* St 8.1 strain under conditions simulating the manufacture and maturation of fermented dairy products. Using quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), it was observed that activation of the GAD operon requires a pH below 5.0. Additionally, the expression of the *gad* genes is differently affected by specific environmental signals: it increases in the presence of NaCl and decreases in the presence of lactose.

# Introducción



## 1. Introducción

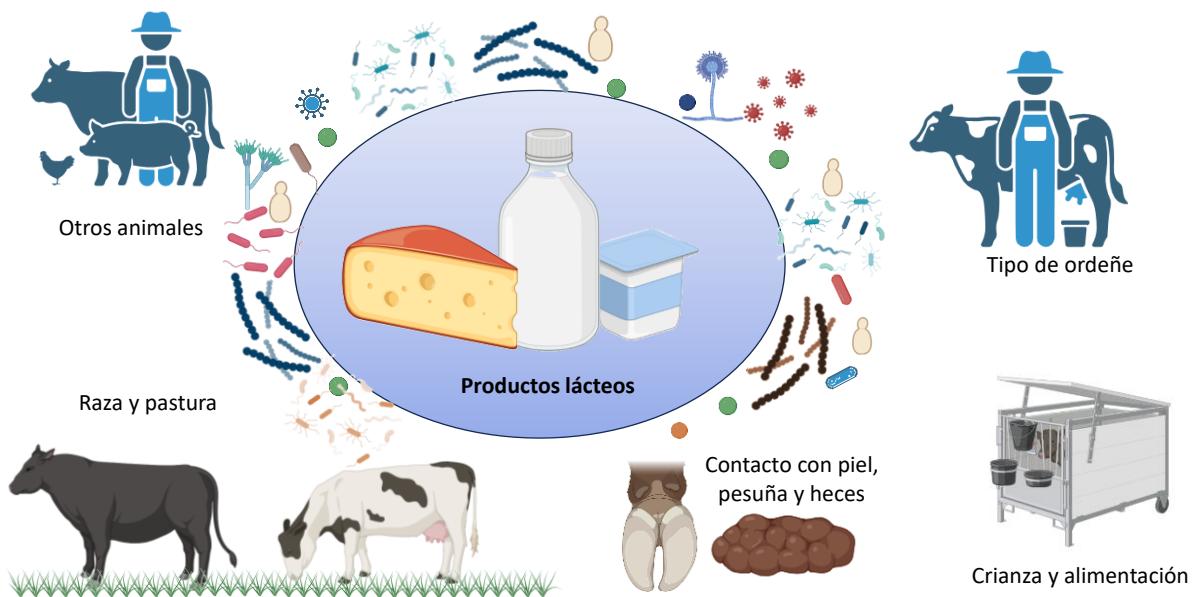
La fermentación es, sin duda, una de las técnicas más antiguas de conservación de alimentos y utilizada por el hombre desde la antigüedad. Constituye una forma sencilla de obtener productos con características sensoriales distintas a las de sus materias primas y propiedades nutritivas mejoradas (Bourdichon et al., 2012a). Junto a otras fermentaciones alimentarias, la fermentación de la leche es una de las más importantes. La fermentación natural o espontánea de la leche se origina por el desarrollo de diversas especies de bacterias ácido-lácticas (BAL), un grupo microbiano que produce ácido láctico como metabolito final a partir de la utilización de los carbohidratos (Carr et al., 2002). La fermentación espontánea, con el transcurso del tiempo, se reemplazó por la adición de fermentos o cultivos iniciadores. Éstos, están constituidos por una o más cepas de una o varias especies de BAL cuidadosamente seleccionadas. Los cultivos iniciadores más típicos contienen cepas de los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y del antiguo género *Lactobacillus* (Rezac et al., 2018). La diversidad de los productos lácteos fermentados es amplia como consecuencia del empleo de leche de diferentes especies animales o sus mezclas y diferentes tecnologías de elaboración y maduración (Mayo Pérez, 2010). La tecnología afecta a las características físico-químicas y sensoriales de los productos fermentados, y supone una presión selectiva sobre los microorganismos, inhibiendo a unos y permitiendo el desarrollo de otros, lo que, en último término, influye a su vez en las propiedades sensoriales de los productos fermentados (Montel et al., 2014).

El campo de los productos lácteos fermentados se caracteriza por una constante renovación de los productos como consecuencia de una demanda continua por parte del consumidor. En respuesta a esa demanda, las empresas se involucran en un permanente desarrollo de nuevos tipos de productos lácteos, nuevas presentaciones, nuevas propiedades sensoriales y productos más saludables (Montel et al., 2014). Todo ello exige, también, de nuevos cultivos iniciadores capaces de satisfacer las expectativas del consumidor y de proporcionar mayor valor añadido al producto. Por consiguiente, la identificación de nuevos biotipos con propiedades diferentes o nuevas combinaciones constituye una línea prioritaria como factor de competencia en el sector lácteo (van Hylckama Vlieg et al., 2006; Panda et al., 2018).

### 1.1. Microbiota de la leche y los productos lácteos

La leche es un alimento con alto valor nutritivo debido a su composición en macro y micronutrientes (grasas, proteínas, vitaminas, minerales, entre otros). Estas características nutricionales, sumadas a un pH cercano a la neutralidad, la convierten también en un excelente medio de cultivo. Los microorganismos presentes en la leche constituyen su microbiota. Ésta no es una entidad fija y constante en el tiempo, sino que varía en función, entre otros factores, de las

condiciones ambientales, de la raza, alimentación, salud y bienestar animal, y de las condiciones de ordeño, transporte y almacenamiento (Figura 1). De modo que, por motivos tecnológicos y de seguridad alimentaria, resulta relevante analizar la composición y evolución de la microbiota de los productos lácteos (Quigley et al., 2013; Fusco et al., 2020; Mayo et al., 2023).



**Figura 1.** Fuentes potenciales de microorganismos presentes en la leche cruda y los productos lácteos. Adaptado de Quigley et al. (2013).

La microbiota de la leche y los productos lácteos está constituida por una amplia variedad de microrganismos procariotas, eucariotas y virus. Uno de los grupos más importantes de esta microbiota es el de las BAL, ya que son responsables de la fermentación y transformación de la leche en sus derivados (queso, yogur, entre otros). Los géneros de BAL más comunes en la leche incluyen *Lactococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (Fusco et al., 2020; Mayo et al., 2023).

La calidad y la vida útil de la leche también pueden verse influenciadas negativamente por la presencia de determinados microorganismos; por ejemplo, las bacterias psicrotolerantes que pueden proliferar durante la refrigeración y producir lipasas y proteasas extracelulares que provocan su deterioro. Además, la composición microbiana de la leche puede tener implicaciones relacionadas con la salud, ya que el consumo de leche cruda contaminada con patógenos puede provocar, en algunos casos, enfermedades graves (Quigley et al., 2013; Parente et al., 2020).

### 1.1.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Son un grupo muy heterogéneo de microorganismos que se caracteriza por la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. En general, las BAL son bacterias Gram-

positivas, inmóviles, no esporuladas, no formadoras de pigmentos, variadas morfológicamente (cocos, bacilos, cocobacilos), anaerobias facultativas o microaerófilas, aerotolerantes y son oxidasa y catalasa negativas. Poseen una capacidad biosintética limitada, por lo que requieren un medio nutricionalmente rico para su multiplicación, así como diversos factores de crecimiento: vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos o precursores de los mismos. Este grupo microbiano se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y cuenta con representantes en diferentes nichos ecológicos, como las plantas, la leche, la carne y las mucosas del hombre y los animales (Carr et al., 2002).

Los géneros más típicos de las BAL son *Lactococcus*, *Lactobacillus* (recientemente reclasificado en 25 géneros diferentes), *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus* y *Oenococcus* (Zheng et al., 2020). Todos ellos, pertenecen al filo *Bacillota* y orden *Lactobacillales* y se caracterizan por presentar un bajo contenido de G+C en sus genomas (entre el 30 y el 50%). De forma frecuente, por encontrarse en los mismos hábitats o por su utilización en aplicaciones similares, los géneros *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* se suelen relacionar ocasionalmente entre las BAL. Estos últimos géneros, sin embargo, no están emparentados filogenéticamente con las BAL, pertenecen al filo *Actinomycetota* y presentan un contenido de G+C mayor del 50% en sus genomas (Breitenwieser et al., 2020).

Según el producto final de la fermentación, las BAL se dividen en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas; estas últimas se subdividen en especies heterofermentativas facultativas y obligadas. Las especies de *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y algunos lactobacilos (Grupo I) se consideran homofermentadoras obligadas, debido a su capacidad de fermentar hexosas casi por completo a ácido láctico por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), mientras que no son capaces de degradar las pentosas (Pessione, 2012). Las BAL heterofermentadoras facultativas, que incluyen especies de lactobacilos (Grupo II), degradan hexosas a ácido láctico a través de la vía EMP y pueden metabolizar pentosas (y a menudo gluconato), ya que poseen tanto aldolasa como fosfocetolasa (Felis & Dellaglio, 2007). Las BAL heterofermentadoras estrictas, como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* y algunos lactobacilos (Grupo III), no pueden utilizar hexosas a través de la vía EMP debido a la falta de la enzima glicolítica fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa. Por ello, degradan las hexosas por la vía del fosfogluconato, produciendo no solo ácido láctico como producto final, sino también cantidades equimoleculares de etanol o ácido acético y dióxido de carbono (Pessione, 2012). Estas agrupaciones, sin embargo, no parecen deberse a relaciones evolutivas entre los grupos estudiadas mediante análisis genómicos (Zhang et al., 2011; Salvetti et al., 2013), sino que parecen deberse a adaptaciones producidas durante la ocupación de los diversos hábitats en que se encuentran.

La principal función de las BAL en los productos lácteos es la transformación de sus componentes: la lactosa se convierte en ácido láctico, las proteínas se descomponen en péptidos y aminoácidos, y, en menor grado, los lípidos se transforman en ácidos grasos libres. Estos procesos generan compuestos con una mayor biodisponibilidad y de interés organoléptico puesto que participan en la textura y en el aroma y sabor de los productos (Penna et al., 2015). La rápida disminución del pH y la producción de otros metabolitos, como bacteriocinas y ácidos orgánicos, hacen que el desarrollo de las BAL tenga además un efecto inhibidor sobre el crecimiento de muchos microorganismos alterantes y patógenos (Arqués et al., 2015).

Algunas cepas de BAL poseen, además, propiedades funcionales y por tanto se las considera microorganismos probióticos, definidos como ‘microrganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un efecto beneficioso en la salud del huesped (ISAPP, 2014). La mayoría de los microorganismos probióticos pertenecen a los grupos de lactobacilos y bifidobacterias.

Desde el punto de la seguridad, las BAL están avaladas por el sello GRAS (*Generally Regarded as Safe*) de acuerdo con la FDA (*US Food and Drug Administration Agency*) y por el estatus QPS (*Qualified Presumption of Safety*) de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria.

#### *Lactococcus*

Es un género que forma parte de la familia *Streptococcaceae*, constituido por BAL mesófilas que tienen una temperatura óptima de crecimiento de 30°C. Estas bacterias son homofermentadoras y presentan una forma cocoide, pudiendo encontrarse solas o en pequeñas cadenas. Por lo general, no son patógenas. Todas las especies que integran este género son capaces de producir ácido láctico a partir de lactosa, glucosa, fructosa, manosa y N-acetilglucosamina. El género incluye en la actualidad 27 especies y 10 subespecies, entre las que se encuentran *L. cremoris* con las subespecies (subsp.) *cremoris* y *tructae*; *L. formosensis* con las subsp. *formosensis* y *bovis*; *L. garvieae* con las subsp. *garvieae* y *bovis*; y *L. lactis* con las subsp. *lactis* (incluyendo la biovar. *diacetylactis*) y *hordniae* (Parte et al., 2020).

Las especies *L. lactis* y *L. cremoris* son las mejor caracterizadas entre todas las BAL debido a su amplia utilización en la industria quesera. Se trata de bacterias relativamente simples, con un genoma de unos 2,4-2,6 Mbp, y un contenido de G+C del 35%. Un tipo particular de *L. lactis* subsp. *lactis* lo constituye la biovariedad *diacetylactis*; las cepas de esta variedad se caracterizan por sintetizar diacetilo, y su forma reducida, la acetoína, a partir del citrato de la leche. Ambos son compuestos aromáticos que dan lugar al aroma característico de la mantequilla y de diversos tipos de quesos. Las cepas de la biovariedad *diacetylactis* tienen una permeasa específica de codificación plasmídica que les permite incorporar citrato a partir del medio (van Mastrigt et al., 2018). Dicho citrato se convierte

en oxalacetato y ácido acético por la acción de la enzima citrato liasa. Mediante descarboxilación enzimática, el oxalacetato se transforma en piruvato, a partir del cual se forma el compuesto intermediario  $\alpha$ -acetolactato y acetaldehído, y finalmente, a partir de este último, se obtiene el diacetilo.

#### *Lactobacilos*

Los lactobacilos son bacterias mesófilas o termófilas de morfología bacilar. El grupo estaba constituido por unas 260 especies con gran diversidad ecológica, fenotípica y genética. Por este motivo, de forma reciente, el antiguo género *Lactobacillus* se dividió en 25 nuevos géneros (Zheng et al., 2020). El tamaño del genoma oscila entre 1,8 y 3,3 Mbp, y el contenido G+C entre 33 y 51%. Las especies más utilizadas para la elaboración de productos lácteos fermentados son *Lactobacillus* (*Lb.*) *delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus* (*Lpb.*) *plantarum* y *Lacticaseibacillus* (*Lcb.*) *casei*.

#### *Leuconostoc*

Las bacterias del género *Leuconostoc* son heterofermentadoras estrictas y, como tales, producen CO<sub>2</sub>, etanol y ácido acético en cantidades equimolares al ácido láctico de tipo D (-). Están presentes en leches fermentadas naturales y en el kéfir, y su contribución al *flavor* de los productos permite su uso como componentes en varios cultivos iniciadores mesófilos comerciales. Aunque su capacidad productora de ácido láctico es baja, algunas especies como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* y *Leuconostoc lactis* contribuyen a la producción de diacetilo y otros compuestos aromatizantes mediante la fermentación del citrato, de forma similar a como lo lleva a cabo *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Björkroth et al., 2014).

#### *Streptococcus thermophilus*

Ésta, es la única especie del género *Streptococcus* que se emplea como cultivo iniciador en la industria. De hecho, tras *L. lactis*, *S. thermophilus* es la especie de BAL más utilizada como fermento para productos lácteos como yogur y una gran variedad de quesos como Mozzarella, Cheddar, Parmesano, Emmental, Gruyere, entre otros y, por tanto, la segunda también en importancia desde el punto de vista económico (Fox et al., 2017; Bintsis, 2018). *S. thermophilus* es una especie homofermentadora, que produce ácido láctico y metabolitos secundarios como el acetaldehído. Es también una especie termófila con una temperatura óptima de crecimiento alrededor de 42°C. Evolutivamente, *S. thermophilus* está emparentada con la especie patógena *Streptococcus salivarius*. Sin embargo, en la primera, los genes de patogenicidad y virulencia se perdieron durante la reducción genómica que ha tenido lugar en esta especie en su adaptación a los productos lácteos. Además, en este proceso las cepas adquirieron otros genes de gran importancia para el ecosistema lácteo, como

algunos para la producción de polisacáridos extracelulares (PES), tolerancia al estrés o inmunidad a bacteriófagos (Zhao et al., 2023).

#### 1.1.2. Otros tipos bacterianos

Mediante cultivo, en una misma muestra de leche, se llegaron a identificar más de 125 especies de 60 géneros distintos que no pertenecen a las BAL, aunque solo 23 presentaron una abundancia mayor del 1% (Mayo et al., 2023). Entre los géneros predominantes se pueden citar, también, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y *Microbacterium*. La gran profundidad de análisis de las técnicas moleculares, permitió detectar otros muchos taxones minoritarios, algunos no asociados previamente con leche como *Marinomonas*, *Prevotella* o *Catenibacterium* (Breitenwieser et al., 2020). Gran parte de los microorganismos identificados exclusivamente mediante técnicas metagenómicas pertenecen a bacterias que crecen en anaerobiosis o que no se desarrollan con facilidad en los medios de cultivo de uso general. Este es el caso de las especies de los géneros *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotella* o *Catenibacterium*. Por el contrario, especies de otros géneros, como *Paenibacillus*, *Propionibacterium*, *Jonesia*, *Morganella*, *Mycobacterium* y *Tsukamurella*, se detectan únicamente tras cultivo (Oikonomou et al., 2020). Lo que sugiere que, para la caracterización de la microbiota de la leche y los productos lácteos, las técnicas de cultivo y las moleculares son complementarias. Más allá de su contribución a la diversidad, se desconoce el significado de la presencia de muchos de estos microorganismos minoritarios en relación con la seguridad alimentaria o la tecnología de los productos lácteos (Mayo et al., 2023).

#### 1.1.3. Mohos y levaduras

Diversas especies de mohos y levaduras presentes en el ambiente pueden contaminar la leche, y algunas pueden desarrollarse en ésta y en los productos lácteos. Su capacidad para metabolizar la lactosa y otros ácidos orgánicos presentes en la leche, como el ácido láctico, cítrico y succínico, junto con sus actividades proteolíticas y lipolíticas, les permite aprovechar los nutrientes de este medio (Mayo et al., 2021). Además, mohos y levaduras toleran niveles bajos de pH y actividad de agua ( $a_w$ ), son capaces de crecer a bajas temperaturas y en altas concentraciones de sal, condiciones comunes durante la maduración de muchos productos lácteos (Tapía et al., 2020). Los géneros más comunes en la leche y sus derivados incluyen especies de los géneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* y *Saccharomyces* (Awasti & Anand, 2020).

En algunos casos, la presencia de mohos y levaduras es beneficiosa, ya que confieren características organolépticas deseables a los productos lácteos. Por ejemplo, diversas levaduras son esenciales en la elaboración de productos como kéfir, kumis, viili y otras leches fermentadas del norte

de Europa y África (Irkin, 2019). En los quesos, participan en la degradación del ácido láctico, desacidificando la pasta y permitiendo el asentamiento y desarrollo de poblaciones secundarias. Sin embargo, pueden causar diversas alteraciones en los alimentos. Estos microorganismos pueden producir gas en exceso, cambios de color debido a la síntesis de pigmentos, alteraciones en la textura por intensa proteólisis, producción de aromas indeseados y toxinas (Barbosa et al., 2021).

Las especies de levaduras predominantes en los productos lácteos incluyen *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia fermentans*, *Pichia membranaefaciens* y *Rhodotorula mucilaginosa*, que contribuyen a los procesos de maduración mediante sus variadas actividades enzimáticas. En cuanto a los mohos, especies como *Penicillium camemberti* y *Penicillium roqueforti* son esenciales en la maduración de quesos tipo Brie, Camembert y quesos azules. Estos mohos son responsables del aspecto y características organolépticas de los quesos, debido a su intensa lipólisis y proteólisis. *Geotrichum candidum*, aunque considerado una levadura, es uno de los mohos lácticos más típicos y consume lactato, favoreciendo el crecimiento de poblaciones secundarias (Awasti & Anand, 2020; Bates & Clark, 2023).

#### 1.1.4. Cultivos iniciadores y de maduración

Tradicionalmente, las fermentaciones se llevaron a cabo de forma empírica por la acción de microorganismos presentes en las materias primas y por la contaminación microbiana accidental procedente del ambiente, de las herramientas empleadas o de los propios productores. La microbiota natural de la leche presenta una diversidad y composición variable, aunque puede, en cierto sentido, homogenizarse, por los procesos a los que se somete para su higienización (Capozzi et al., 2017). Si bien, para evitar productos finales con características poco uniformes, con defectos y alteraciones organolépticas o problemas de seguridad alimentaria, la fermentación espontánea se fue sustituyendo por la fermentación inducida mediante la utilización de cultivos iniciadores o fermentos añadidos deliberadamente a la leche y que están constituidos por una o más cepas de una o más especies microbianas seleccionadas y bien caracterizadas. De esta manera, se incrementa el control sobre la fermentación y la seguridad higiénico-sanitaria de los productos fermentados (García-Díez & Saraiva, 2021).

### 1.2. Rol de los fermentos en los productos lácteos

La maduración de productos lácteos es un proceso en el cual los microorganismos presentes proliferan y, como resultado, desarrollan el sabor y textura característicos del producto final. Este procedimiento se lleva a cabo en condiciones controladas de temperatura y humedad, en espacios destinados a tal fin. Durante la maduración de productos lácteos como el queso, la mantequilla o el

yogur, las bacterias lácticas presentes en la leche utilizan los azúcares y proteínas presentes, produciendo ácido láctico que actúa como conservante natural y contribuye al sabor del producto final. El tiempo de maduración varía según el tipo de producto lácteo que puede ser de días, semanas o incluso meses. Durante este período, los sabores se desarrollan e intensifican, y la textura del producto se vuelve más firme o cremosa, dependiendo del tipo de maduración (Penna et al., 2015).

### 1.2.1. Bioquímica de las fermentaciones lácteas

#### *Metabolismo de la lactosa*

La lactosa es un azúcar presente prácticamente solo en la leche y productos lácteos. Es un disacárido formado por una molécula de glucosa y una de galactosa. Su metabolismo consta de dos etapas (Figura 2), el transporte del azúcar al interior de la célula y su posterior hidrólisis (Bintsis, 2018; Walker & Thomas, 2019).

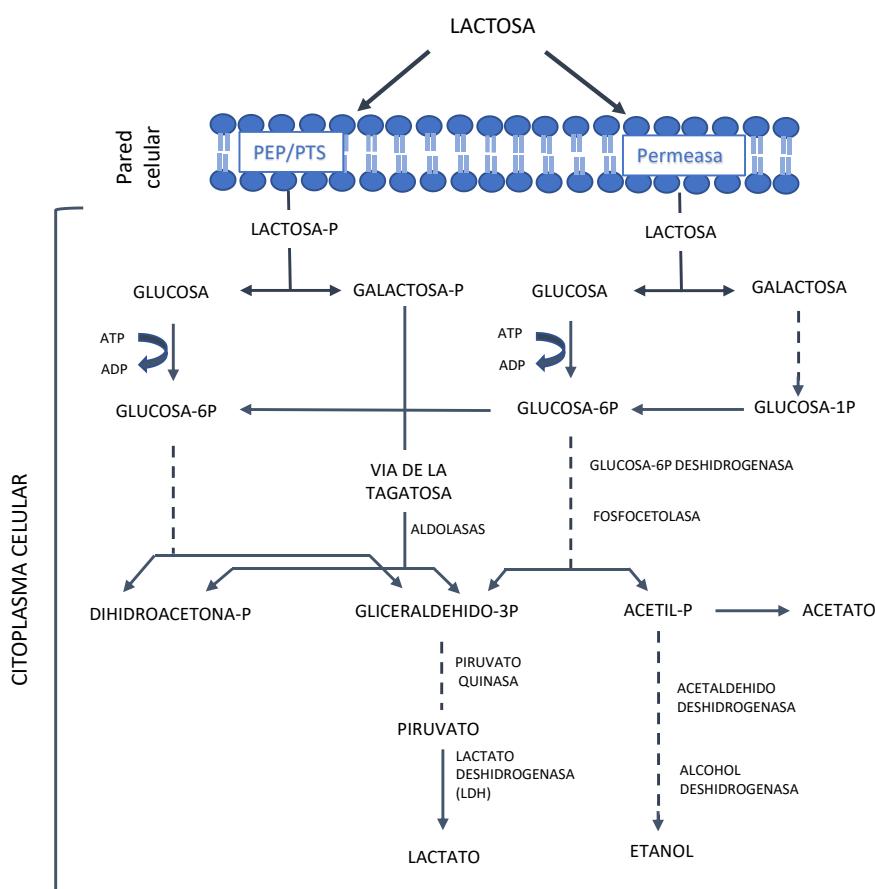


Figura 2. Metabolismo de la lactosa en las bacterias ácido-lácticas.

La primera fase implica la absorción de lactosa por la célula bacteriana y la producción de monofosfatos de hexosas. Se identificaron dos mecanismos que facilitan el transporte al interior celular: a) el sistema dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP/PTS), que convierte la lactosa en lactosa-P para su transporte hacia el interior celular. Dentro de la célula, una fosfo- $\beta$ -galactosidasa ( $P\text{-}\beta\text{-gal}$ )

descompone la lactosa-P en glucosa y galactosa-6-P. Luego, la glucosa se transforma en glucosa 6-P, y ambos azúcares son metabolizados posteriormente. b) el sistema de transporte dependiente de ATP permite que la lactosa atraviese la membrana en forma directa y sea hidrolizada a glucosa y galactosa mediante la acción de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal o lactasa). La glucosa se convierte en glucosa 6-fosfato, y las bacterias que pueden fermentar la galactosa la transforman también en glucosa 6-P a través de la vía de Leloir. Estos dos mecanismos se encuentran en la mayoría de las BAL. Sin embargo, el sistema de transporte PEP/PTS es más común en las bacterias mesófilas homofermentativas, mientras que el sistema de permeasa prevalece en las bacterias homofermentativas termófilas, por ejemplo, en *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Estas bacterias del yogur carecen de las enzimas de la ruta de Leloir, por ende, la galactosa no es hidrolizada, sino que se excreta o se convierte en polisacáridos, lo cual contribuye a generar la textura cremosa del yogur (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

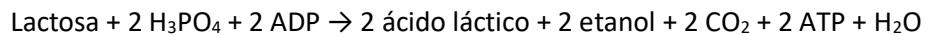
En la fermentación láctica homofermentativa, la glucosa se convierte a través de la vía glicolítica o la ruta de Embden-Meyerhof, mientras que la galactosa 6-P se incorpora a la ruta de la tagatosa. Las enzimas cruciales que controlan este proceso incluyen las aldolasas, que facilitan la conversión de hexosas difosfato en gliceraldehido-3P; la piruvato quinasa (PK), que es fundamental para la producción de piruvato; y la lactato deshidrogenasa (LDH), que cataliza la transformación de piruvato en ácido láctico. El metabolismo homofermentativo se puede resumir en la siguiente reacción:



La actividad de las diversas enzimas involucradas en esta vía metabólica y la síntesis de los metabolitos adecuados regulan la absorción de lactosa por las bacterias, hasta que el aumento de acidez inhibe el crecimiento de las bacterias lácticas. En el caso de *Lactococcus*, esto ocurre cuando se genera entre un 0,6 y 0,9% de ácido láctico, mientras que en los lactobacilos homofermentativos, los niveles críticos se encuentran entre el 1,8 y 2,5% (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004). Si la acidez no interfiere con su desarrollo, podrían transformar entre el 90 y el 95% de la lactosa en ácido láctico. Este fenómeno se utiliza tecnológicamente para generar grandes volúmenes de ácido láctico a partir de *Lb. helveticus*. La distinción entre el crecimiento y la producción de ácido láctico se atribuye a las diferentes sensibilidades de las enzimas que participan en las reacciones metabólicas de crecimiento y glicólisis, dependiendo de las condiciones del entorno (pH, temperatura) (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

En la fermentación láctica heterofermentativa, las BAL no son capaces de fermentar la lactosa en la primera etapa de la vía glicolítica. La acción de la glucosa-6-P-deshidrogenasa y la fosfocetolasa facilita el metabolismo a través de la ruta del 6-P-gluconato. La fosfocetolasa descompone el 6-P-

gluconato en dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y pentosa-5-P, que se transforma posteriormente en gliceraldehído-3-P y acetil-P. El gliceraldehído-3-P se integra a la vía glicolítica, mientras que el acetil-P se convierte en etanol en ausencia de otros aceptores de hidrógeno. El proceso metabólico heterofermentativo se puede expresar mediante la siguiente reacción:



El ácido láctico producido durante la fermentación puede ser de tipo dextrógiro L (+) o levógiro D (-), en función de la enzima bacteriana involucrada, ya sea L- o D-lactato deshidrogenasa. Algunas bacterias lácticas contienen ambas enzimas, aunque generalmente en proporciones desiguales; cuando estas proporciones son equitativas, el producto resultante se denomina mezcla racémica (DL). Alternativamente, ciertas cepas bacterianas pueden generar este tipo de mezcla al poseer la enzima lactato racemasa, la cual convierte un isómero en otro (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

### *Proteólisis*

Las bacterias lácticas son muy exigentes en cuanto a necesidades nutritivas, y muchas son auxotróficas para varios aminoácidos; estos los pueden proveer los aminoácidos libres o péptidos de bajo peso molecular resultantes de la proteólisis. En las bacterias lácticas, el metabolismo proteolítico se divide en la degradación de proteínas y, el transporte y la degradación de péptidos. Este proceso se inicia con la proteinasa de la envoltura celular (CEP), que degrada las proteínas a oligopéptidos. La segunda etapa de la degradación proteica es la transferencia de dipéptidos, tripéptidos y oligopéptidos al interior de las células. En bacterias lácticas, se informan tres sistemas de transporte, transportadores para oligopéptidos (Opp), para dipéptidos y tripéptidos (DtpP y DtpT, respectivamente) y para aminoácidos. Los péptidos, finalmente, se degradan en el interior celular a aminoácidos por una variedad de peptidasas, que incluyen endopeptidasas, aminopeptidasas, dipéptidasas, tripéptidasas y peptidasas amino-acido específicas (Wang et al., 2021).

Las bacterias lácticas que no poseen componentes esenciales del sistema proteolítico para crecer en leche (como las cepas proteinasa negativas, Prt -), necesitan de la presencia de cepas con esta actividad o que el medio de cultivo posea los metabolitos necesarios para su desarrollo. La simbiosis de las bacterias del yogur, en parte, se basa en este hecho (Kieliszek et al., 2021). Además de en el crecimiento, algunos aminoácidos (especialmente la glutamina, el ácido glutámico y la arginina) desempeñan un papel importante en la adaptación de las bacterias lácticas al medio ácido. El  $\text{NH}_3$  liberado durante la desaminación de los aminoácidos puede aumentar el valor del pH dentro y fuera de la célula, protegiéndola así del estrés ácido. Finalmente, los aminoácidos son el sustrato más

importante para la formación de una gama numerosa y variada de compuestos de aroma y sabor, los cuales se forman a través de numerosas reacciones catabólicas (Cadwallader & Singh, 2009).

### *Lipólisis*

Un proceso bioquímico esencial durante la maduración de productos lácteos, y particularmente en la producción de algunos tipos de quesos es la lipólisis. Éste, implica la degradación enzimática de los triacilglicéridos presentes en la grasa de la leche, produciendo ácidos grasos libres (AGL), glicerol, e intermediarios tales como monoacilglicéridos y diacilglicéridos. Los AGL, por sí mismos, son compuestos aromatizantes (por ejemplo, en los quesos de leche de cabra). Pero, además, pueden reaccionar con alcoholes o grupos sulfhidrilos libres para formar ésteres y tioésteres, respectivamente, o actuar como precursores de otros compuestos como las lactonas (Bintsis, 2018).

#### 1.2.2. Aumento de la vida útil y mejora de la seguridad alimentaria

La vida útil de un alimento se define como el tiempo finito después de su producción en condiciones controladas de almacenamiento, en las que no habrá una pérdida apreciable de sus propiedades físico-químicas y sensoriales, ni sufrirá un cambio en su perfil microbiológico que pueda causar deterioro o afectar a la salud de los consumidores. Un alimento logra alcanzar su estabilidad microbiológica después de que es expuesto a técnicas de conservación, simples o múltiples, para eliminar, reducir o prevenir el crecimiento microbiano. Sin embargo, más allá de contribuir a la transformación de la materia prima en los alimentos fermentados, la presencia de microorganismos en los alimentos no siempre representa una amenaza, sino que desempeñan diferentes roles (Carrillo Inungaray & Reyes Munguía, 2014).

### *Producción de bacteriocinas*

La bioconservación es una metodología que aumenta la vida útil y mejora la seguridad de los alimentos utilizando una microbiota natural o controlada y/o sus productos antimicrobianos (Rendueles et al., 2022). Las bacteriocinas son péptidos de origen proteico que se generan principalmente a través del metabolismo de ciertas BAL. A concentraciones reducidas, estos péptidos demuestran eficacia en la inhibición de microorganismos. Las BAL productoras de bacteriocinas, además de su capacidad para iniciar procesos de fermentación, tienen el potencial de ser empleadas como conservantes biológicos, lo que sugiere que podrían sustituir a los conservantes sintéticos en el futuro (Rendueles et al., 2022; Gholami-Shabani et al., 2023). La pediocina, sintetizada por cepas de *Pediococcus acidilactici*, se destaca por su notable capacidad para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, lo cual la posiciona como una bacteriocina de significativo potencial para la conservación de productos lácteos, vegetales y cárnicos. Por otra parte, la nisin, una bacteriocina de tipo lantibiótico producida por cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, es una de las más estudiadas debido a

su potente acción contra bacterias Gram positivas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Bautista & Barrado, 2023).

#### 1.2.3. Alimentos funcionales

En los últimos años, el ser humano mostró un interés continuo por comprender cómo la alimentación y la nutrición influyen en la salud, lo que llevó a buscar estrategias que mejoren el bienestar y la calidad de vida de la población a través de la dieta. En este contexto, se desarrolló y comercializó un nuevo concepto en la industria alimentaria: los “alimentos funcionales”, que se convirtieron en una tendencia global, debido a su capacidad para incorporarse rápidamente al mercado (Villamil et al., 2020). Los alimentos funcionales son aquellos que, además de sus propiedades estrictamente nutricionales, proporcionan algún beneficio adicional que contribuye al mantenimiento o mejora del estado de salud (Katan & De Roos, 2004). La funcionalidad se puede alcanzar de tres formas: (i) la eliminación o reducción de un componente perjudicial, (ii) el incremento en la concentración o biodisponibilidad de un componente indispensable o (iii) la adición de un componente saludable que no está presente en el alimento original. Tanto en Europa como en Argentina, aunque no existe definición legal de “Alimento Funcional”, el concepto se encuentra instalado en los mercados, de manera que el consumidor acepta y demanda alimentos con estas propiedades.

#### 1.2.4. Elaboración de productos lácteos funcionales y producción de sustancias bioactivas

En el ámbito de la industria alimentaria, la creación de productos lácteos funcionales ganó gran relevancia. Numerosos productos lácteos se publicitan con alegaciones de salud, tales como leches descremadas, sin lactosa, enriquecidas en compuestos bioactivos (vitaminas, calcio, esteroles vegetales, entre otros). En los productos fermentados la funcionalidad se promueve, en muchos casos, por la actividad biológica de los microorganismos que participan en la fermentación (Bourdichon et al., 2012b). La selección de cultivos con propiedades funcionales específicas permite también el desarrollo de alimentos con nuevas propiedades (Montel et al., 2014).

Un aspecto clave en el desarrollo de alimentos funcionales es la producción de sustancias bioactivas, que pueden aportar beneficios adicionales a los alimentos. La producción de estas sustancias cobró una relevancia creciente en los últimos años debido a su potencial para mejorar la salud humana y su aplicación en diversas industrias, incluyendo la alimentaria, farmacéutica y cosmética (Biesalski et al., 2009). Entre estas sustancias, los exopolisacáridos, los péptidos bioactivos, el ácido linoleico conjugado (CLA) y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) destacan por sus propiedades funcionales y beneficios para la salud.

### *Exopolisacáridos (EPS)*

Los EPS son polisacáridos secretados al medio exterior por una variedad de microorganismos, incluidos bacterias y hongos. Estos compuestos se asocian a múltiples propiedades funcionales, incluyendo efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Abarquero et al., 2022). Desde el punto de vista tecnológico, tienen la capacidad de actuar como agentes emulsificantes y gelificantes. Estas propiedades son aprovechadas en la producción de derivados lácteos fermentados, en particular en la producción de yogurt, queso y crema fermentada, entre otros. Los EPS contribuyen a la textura, reología, sabor, percepción sensorial y estabilidad final del producto (Korcz & Varga, 2021). Los géneros bacterianos como *Leuconostoc* y diversos géneros de lactobacilos son ampliamente conocidos por su capacidad para sintetizar EPS. Además de sus propiedades tecnológicas, se describieron propiedades funcionales asociadas a los EPS, como en el caso de los EPS producidos por *Lacticaseibacillus (Lcb.) rhamnosus* GG, que mostraron efectos beneficiosos para la salud intestinal. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH, la concentración de sustratos y la presencia de nutrientes específicos, juegan una función crucial en la producción y las características de los EPS (Li et al., 2020; Riaz Rajoka et al., 2020).

### *Péptidos bioactivos*

Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteínas (2-20 aminoácidos) con diversas funcionalidades biológicas; algunos ejercen efectos positivos sobre la salud. Se obtienen principalmente a través de la digestión enzimática de proteínas o mediante métodos de fermentación utilizando microorganismos. Los péptidos derivados de la leche, los cereales y las legumbres son de especial interés, dado que demostraron tener propiedades antihipertensivas, antioxidantes y antidiabéticas (Korhonen & Pihlanto, 2006). Investigaciones recientes enfatizan el potencial de los péptidos bioactivos en la modulación del sistema inmune, así como en la mejora de la salud cardiovascular. La producción de estos péptidos a través de fermentación controlada ofrece una ventaja sustancial, permitiendo la obtención de alimentos con actividades bioactivas (Nongonierma & Fitzgerald, 2016).

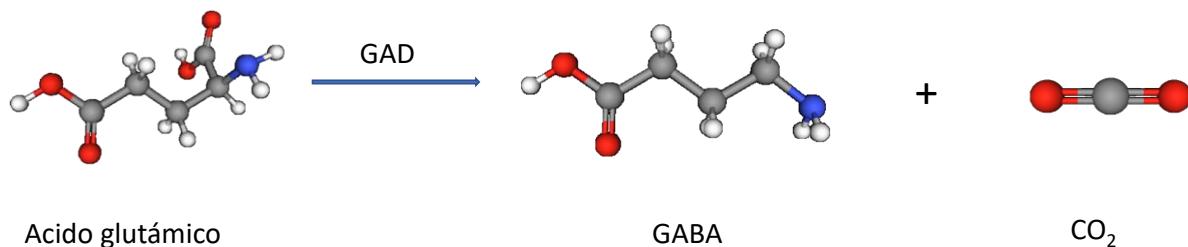
### *Ácido linoleico conjugado*

El ácido linoleico conjugado (*conjugated linoleic acid*; CLA) es un término químico que abarca a los isómeros del ácido octadecadienoico con enlaces dobles conjugados. Esta mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico se encuentra naturalmente en rumiantes y productos lácteos. En las últimas décadas, el CLA captó considerable atención debido a sus beneficios biológicos y fisiológicos, tales como propiedades anti-obesidad, anti-cardiovasculares, anti-diabéticas, anticancerígenas y anti-inflamatorias. Estos beneficios convirtieron al CLA en un tema de investigación destacado en los últimos años. De forma específica, cada isómero de CLA muestra una actividad

biológica distinta; por ejemplo, el t10, c12-CLA es eficaz para el control de peso, mientras que el c9, t11-CLA es más eficiente en la prevención de cáncer (Li et al., 2023). La producción de CLA se puede llevar a cabo mediante la isomerización del ácido linoleico que se encuentra en productos lácteos y en la carne de rumiantes. Investigaciones recientes exploraron el potencial de microorganismos como *L. lactis* y *Bifidobacterium* spp. para la conversión de ácidos grasos en isómeros de CLA, lo que representa un nuevo enfoque biotecnológico de producción (Azari et al., 2022; Mileriene et al., 2023).

### 1.3. Ácido gamma-aminobutírico (*gamma aminobutyric acid - GABA*)

Este compuesto es un aminoácido no proteico sintetizado a partir del ácido glutámico (Figura 3). La transformación del ácido glutámico en GABA se lleva a cabo por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) utilizando fosfato de piridoxal (la forma activa de la vitamina B6) como cofactor (Yogeswara et al., 2020).



**Figura 3.** Reacción de descarboxilación del ácido glutámico para la producción de GABA mediante la enzima glutamato descarboxilasa GAD.

En el sistema nervioso central de los humanos, el glutamato (excitador) y el GABA (inhibidor) son unos de los principales neurotransmisores del impulso nervioso. La inhibición del impulso generado por el GABA disminuye el estrés y mejora el sueño, actuando como un tranquilizante (Hepsomali et al., 2020). Además, el GABA modula la función renal y disminuye la presión arterial, lo cual dota al compuesto de propiedades diuréticas e hipotensoras (Ngo & Vo, 2019). Algunos de estos efectos se demostraron en ensayos clínicos aleatorizados (Inoue et al., 2003; Shimada et al., 2009; Pouliot-Mathieu et al., 2013), lo que respalda la posible influencia beneficiosa del GABA en la salud y el bienestar de los consumidores. Estas actividades del GABA suscitaron mucho interés de la industria por la posibilidad de desarrollar alimentos funcionales enriquecidos con este compuesto bioactivo (Essa et al., 2023).

#### 1.3.1. Fisiología del GABA

El GABA es un inhibidor de la transmisión nerviosa y su función es clave en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Su presencia ubicua en el cerebro y la médula espinal sugiere que casi todas las neuronas liberan GABA, expresan receptores GABA o están inervadas por neuronas que lo hacen. Por lo tanto, es probable que la mayoría de las funciones cerebrales impliquen al GABA como

un neurotransmisor de gran importancia, ya que participa en el 40% de las sinapsis de vertebrados adultos. Una vez liberado en la sinapsis, el GABA se une a los receptores específicos GABA<sub>A</sub> (ionotrópicos) y GABA<sub>B</sub> (metabotrópicos), modulando la excitabilidad neuronal y promoviendo efectos inhibitorios sobre la transmisión sináptica. Esta función es crítica para el equilibrio del sistema nervioso, así como en procesos como la regulación del ciclo sueño-vigilia, la reducción de la ansiedad y la modulación del dolor (Bormann, 2000; Meldrum, 2000).

Existen evidencias que sugieren que los suplementos orales de GABA llegan al cerebro en concentraciones capaces de ejercer efectos biológicos en humanos y animales que afectan al estado de ánimo y a las actividades del sistema nervioso central (Johnston & Beart, 2024). Por ejemplo, en un estudio reciente, un ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, se demostró que 75 mg de GABA oral favorecían el sueño en pacientes con insomnio (Yoon et al., 2022). La presencia de GABA en el intestino por la acción de la microbiota intestinal o tras el consumo de alimentos y bebidas enriquecidas, podría contribuir indirectamente a través de las funciones y trastornos mediados por el eje intestino-cerebro, incluyendo la depresión y la ansiedad, y los trastornos inflamatorios y cardiovasculares (Breit et al., 2018).

### 1.3.2. Productos lácteos fermentados enriquecidos en GABA

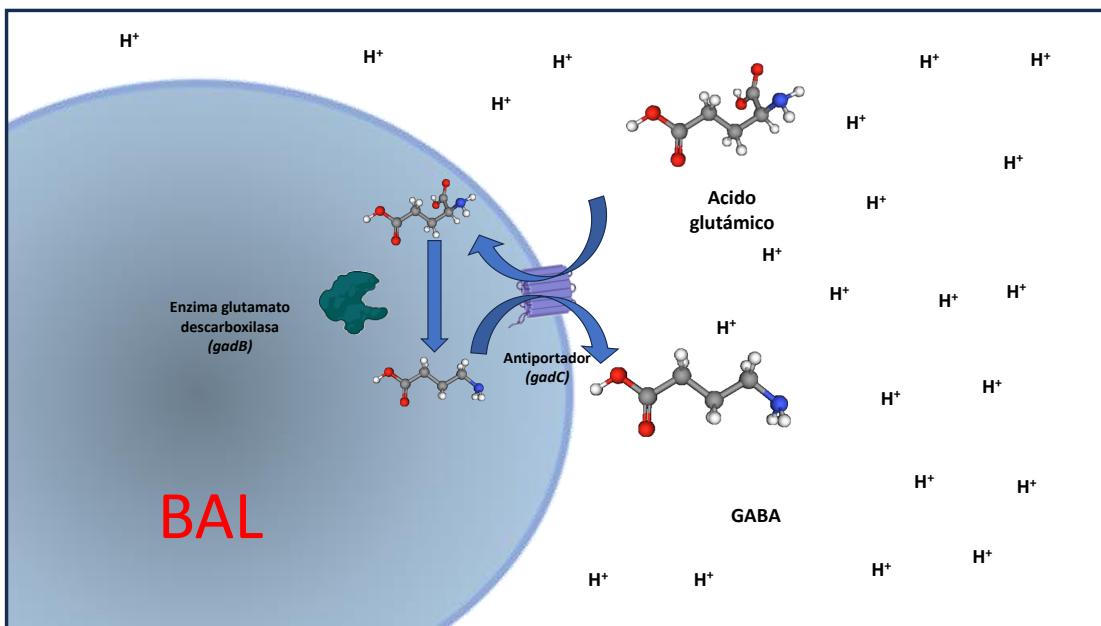
El GABA se encuentra presente en varios productos alimenticios fermentados, incluidos los productos lácteos, donde su producción es resultado de la actividad metabólica de diferentes microorganismos durante el proceso de fermentación. Estos productos no sólo son fuente de nutrientes, sino que también pueden contribuir a la salud mental y física de sus consumidores mediante la mejora de los niveles de GABA en el organismo (Sun et al., 2022).

Las caseínas tienen una alta concentración de ácido glutámico, por lo que el aminoácido precursor de GABA es abundante en leche. En los productos lácteos fermentados, se puede producir GABA si se dispone de ácido glutámico libre y microorganismos (cultivos iniciadores, adjuntos o microbiota contaminante) con actividad descarboxilasa del aminoácido (Nomura et al., 1998; Dhakal et al., 2012; Franciosi et al., 2015).

Con el aumento del interés en los beneficios para la salud asociados con el GABA, surgieron productos lácteos fermentados enriquecidos específicamente con este neurotransmisor. Éstos, son formulados mediante la adición de cultivos bacterianos productores de GABA y la suplementación con glutamato. Se reportaron mejoras en el bienestar mental y reducción de la ansiedad en consumidores de estos productos (Galli et al., 2022). El uso como cultivos iniciadores y/o adjuntos de BAL productoras de GABA permitiría además una producción concomitante a la fermentación, generando

de forma natural productos lácteos funcionales enriquecidos en GABA (Siragusa et al., 2007; Diana et al., 2014; Linares et al., 2016).

### 1.3.3. BAL productores de GABA



**Figura 4.** Producción de GABA por bacterias ácido-lácticas (BAL) a partir de la descarboxilación del ácido glutámico introducido en la célula bacteriana por el antiportador (codificado por el gen *gadC*) y transformado por la acción de la enzima glutamato descarboxilasa (codificada por el gen *gadB*). Adaptado de Cotter & Hill, (2003).

La actividad GAD se detectó en numerosas especies de BAL (Figura 4), como *L. lactis*, *Levilactobacillus (Lvb.) brevis*, *Lcb. paracasei*, *S. thermophilus*, y muchas otras (Siragusa et al., 2007; Diana et al., 2014; Renes et al., 2017). La síntesis de GABA parece dotar a los microorganismos de una mayor resistencia a pH ácido, como el que se encuentra en muchos alimentos fermentados (queso, yogur, leche fermentada, cereales fermentados, entre otros) (Sanders et al., 1998; Su et al., 2011; Sezgin & Tekin, 2023). En ciertas BAL, la descarboxilación de aminoácidos parece estar acoplada a la biosíntesis de ATP, por lo que la conversión de ácido glutámico en GABA proporcionaría a las células de una energía extra que pueden utilizar para su crecimiento (Higuchi et al., 1997).

*Lvb. brevis* es un microorganismo conocido por su capacidad para producir GABA a partir de glutamato durante la fermentación y se aisló de diversos alimentos fermentados, especialmente de productos de soja y vegetales (Cui et al., 2020). Su uso en la fermentación de productos lácteos demostró que su inclusión puede aumentar significativamente los niveles de GABA en el producto final (Zotta et al., 2022). *L. lactis*, ampliamente utilizado en la elaboración de productos lácteos fermentados, también puede sintetizar GABA, lo que contribuye a aumentar el contenido de este compuesto bioactivo en los productos elaborados (Galli et al., 2022). *S. thermophilus*, utilizado en la

producción de yogur y otros productos lácteos, demostró ser capaz de producir GABA. La fermentación de la leche con cepas productoras aumenta el contenido de GABA en los productos fermentados (Carafa et al., 2019; Han et al., 2020).

#### 1.4. Bioquímica y genética de la producción de GABA por BAL

La capacidad de producción de GABA se identificó en muchos grupos microbianos, incluidas especies y cepas de BAL (Siragusa et al., 2007). Como tal, se detectó la presencia de genes *gad* en cepas de *L. lactis*, *S. thermophilus* y diferentes especies de lactobacilos, como *Lvb. brevis*, *Lcb. paracasei*, *Lb. delbrueckii*, entre otros (Yunes et al., 2016; Wu & Shah, 2017; Valenzuela et al., 2024). Los genes *gad* de las BAL se localizan principalmente en el cromosoma bacteriano y se organizan en una estructura similar a un operón.

##### 1.4.1. La enzima glutamato descarboxilasa (*glutamic acid decarboxylase* - GAD)

Esta enzima en *L. lactis* y *S. thermophilus* tiene una masa molecular de 52,3 y 54,0 kDa, respectivamente, y muestra su máxima actividad a un pH de 4,3 y 4,7, respectivamente (Sanders et al., 1998; Lu et al., 2008). En *L. lactis*, la GAD está codificada por un solo gen (*gadB*), que forma parte de un operón (*gadRCB*) que incluye dos genes opuestos corriente arriba, que codifican, respectivamente, un antiportador GABA-glutamato (*gadC*) y un regulador transcripcional (*gadR*) (Sanders et al., 1998; Nomura et al., 2000).

##### 1.4.2. El operón de GABA

El operón *gad* en *L. lactis* es parte de un regulón de estrés ácido y la inactivación del gen *gadB* o *gadC* da como resultado una supervivencia celular reducida a pH bajo (Sanders et al., 1998; Nomura et al., 2000). Genes equivalentes a los de *L. lactis* codifican la enzima GAD y el antiportador en *S. thermophilus* (Sezgin & Tekin, 2023). Sin embargo, el orden de los genes en el operón de esta última especie está invertido (*gadBC*) y el gen que codifica el regulador está ausente (Lu et al., 2008). Además, en *S. thermophilus* el operón *gad* está flanqueado por secuencias derivadas de transposones y secuencias de inserción, lo que sugiere una adquisición reciente por transferencia horizontal (Nomura et al., 2000; Lu et al., 2008; Somkuti et al., 2012).

En las BAL, el operón comprende comúnmente el gen que codifica la glutamato descarboxilasa *gadB*, y a los genes *gadC* y *gadR* (Sarasa et al., 2020; Yugeswara et al., 2020). Sin embargo, la composición genética y la organización estructural de los operones en las especies y cepas de BAL son variables. Algunas especies de BAL tienen un solo gen *gad* que codifica a la enzima GAD, como en *S. thermophilus* y *L. lactis* (Valenzuela et al., 2024). En contraste, otras especies poseen dos genes *gad* (*gadA* y *gadB*), como se informa para *Lvb. brevis*, o incluso tres genes, como para *Enterococcus avium*.

(Gu et al., 2021; Wu & Shah, 2017). Cabe destacar la ausencia del gen *gadR* en los operones GAD de *S. thermophilus*, *Lpb. plantarum* y *Bifidobacterium adolescentis* (Yunes et al., 2016; Valenzuela et al., 2019, 2024). Independientemente del orden, los genes *gadB* y *gadC* siempre se detectaron contiguos dentro del operón GAD, a excepción de las cepas de *Lpb. plantarum* en las cuales se ubican en sitios alejados del cromosoma (Yunes et al., 2016). Además de los genes específicos *gad*, en los operones de algunas BAL se encuentran otros genes, como en *Limosilactobacillus reuteri* que contiene el gen *gls3* que codifica una glutaminasa implicada en la conversión de glutamina en glutamato (Li et al., 2020).

#### 1.4.3. Regulación de la producción de GABA por BAL

En los últimos años, varios estudios abordaron el uso de cepas de BAL productoras de GABA para el desarrollo de productos enriquecidos con GABA, centrándose en el cribado y la aplicación de cepas con propiedades tecnológicas deseables y alto rendimiento en la producción de GABA (Linares et al., 2016; Carafa et al., 2019; Redruello et al., 2021; Zhu et al., 2024). En estos estudios se observó que la producción de GABA está notablemente influenciada por las condiciones de fermentación, tales como la fuente de carbono, la concentración de glutamato, el estrés salino, la temperatura, el pH, entre otros (Mazzoli et al., 2010; Chen et al., 2018), proponiéndose condiciones óptimas de inóculo, temperatura y tiempo de incubación para maximizar la producción de GABA (Chen et al., 2018; Carafa et al., 2019). Sin embargo, la respuesta a estos factores pareciera ser dependiente de cepa; por ejemplo, la adición de piridoxal-5-fosfato (PLP), un cofactor esencial en la reacción de descarboxilación, aumenta la producción de GABA en algunas cepas (Chen et al., 2018), mientras disminuye la producción de GABA en otras (Villegas et al., 2016).

A pesar de que se conoce la estructura génica del operón GAD y de que la producción de GABA se ve influenciada por factores que concurren en el ambiente lácteo, hoy en día los mecanismos que regulan la producción de GABA en cepas de BAL sigue siendo bastante limitado. Este hecho, restringe actualmente el uso eficiente de cepas productoras de GABA como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos enriquecidos en GABA.

# **Contexto y objetivos**



## 1. Contexto y objetivos

En la actualidad, los consumidores prestan mucha atención a la relación entre alimentación y salud, estando dispuestos a comprar y consumir alimentos y bebidas que mejoren su bienestar y salud. Como consecuencia, el mercado de alimentos con propiedades beneficiosas para la salud humana, los denominados alimentos funcionales, ha experimentado un crecimiento notable en los últimos años. El ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), producido por la descarboxilación del aminoácido L-glutámico, es un compuesto con propiedades beneficiosas y, por ende, con un gran potencial para el desarrollo de alimentos que impacten positivamente en nuestra salud. Por tanto, los productos lácteos enriquecidos en GABA podrían considerarse alimentos funcionales. El GABA actúa en el cuerpo humano como un tranquilizante, reduciendo el estrés, disminuyendo la presión sanguínea y modulando la función renal. La incorporación de GABA en yogures, leches fermentadas y quesos responde a una creciente demanda del consumidor por alimentos que no solo aporten nutrientes, sino que también contribuyan a una vida más saludable.

En el contexto actual, la investigación sobre los alimentos lácteos enriquecidos en GABA se ha intensificado, impulsada por la creciente prevalencia de trastornos relacionados con el estrés y la ansiedad en la población global. Diversos estudios han explorado métodos para aumentar los niveles de GABA en productos lácteos, utilizando fermentaciones específicas con bacterias productoras de GABA, principalmente de la especie *Levilactobacillus brevis*, o bien mediante la suplementación con GABA de forma exógena. Además, la aceptación del consumidor y el marketing de estos productos saludables y funcionales están en aumento, lo que representa una oportunidad significativa para la industria láctea. Sin embargo, aún se requieren más investigaciones para estandarizar los procesos de producción y evaluar de manera exhaustiva la síntesis y la biodisponibilidad del GABA en estos productos, así como abordar de manera rigurosa los beneficios de los productos enriquecidos y las posibles barreras regulatorias para sacar los productos al mercado.

En este contexto, el objetivo general de esta Tesis es la selección de BAL productoras de GABA para el diseño de cultivos iniciadores que puedan utilizarse para el desarrollo de derivados lácteos fermentados enriquecidos de forma natural en GABA. El objetivo general se espera alcanzar mediante la consecución de los objetivos específicos que se indican a continuación:

**OBJETIVO 1.-** Identificar y seleccionar cepas de BAL productoras de GABA.

**OBJETIVO 2.-** Caracterizar las propiedades bioquímicas, tecnológicas y de seguridad de las cepas productoras de GABA.

**OBJETIVO 3.-** Ensayar experimentalmente las cepas productoras de GABA en la elaboración de productos lácteos.

**OBJETIVO 4.-** Estudiar los mecanismos reguladores involucrados en la producción de GABA.

# Materiales y métodos





### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Microorganismos, medios y condiciones de cultivo

Como fuente de aislados de *L. lactis* y *S. thermophilus* se utilizaron 24 muestras de leche cruda de vaca procedentes de diferentes zonas de la región de Asturias (norte de España). Los microorganismos mesófilos se aislaron a partir de muestras de leche cruda. Para la recuperación de microorganismos termófilos, se utilizó leche coagulada de manera tradicional, obtenida tras la pasteurización (40 mL) a 63°C durante 30min y posterior incubación durante una noche a 42°C. De cada muestra de leche se seleccionaron al azar, 5 aislados representativos de las distintas morfologías provenientes de cada grupo de mesófilos y termófilos. Los aislados purificados se cultivaron en medio líquido, y tras 24 h las células se recuperaron por centrifugación, se resuspendieron en medio fresco suplementado con glicerol al 20% (v/v) como agente crioprotector y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

En este trabajo de tesis doctoral también se utilizaron 262 cepas de BAL proporcionadas por el Grupo de Cultivos Lácteos Funcionales (IPLA-CSIC) y del Grupo de Biotecnología Microbiana para la Innovación Alimentaria (IMIT-UNNE) de sus colecciones institucionales, que habían sido aisladas de diversos productos lácteos tradicionales. El origen de las diferentes especies y el número de cepas se muestra en el ANEXO I, Tabla 1. Como cepas de referencia, se utilizaron algunas depositadas en la colección belga de microorganismos (*Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Laboratory of Microbiology Ghent University - BCCM/LMG*).

En diferentes etapas del trabajo se emplearon los siguientes medios de cultivo: para el aislamiento o recuento de BAL mesófilas y termófilas *Plate Count Skimmed Milk Agar* (PCMA; Merck) y M17 (Formedium, Hunstanton, Reino Unido) suplementado con glucosa o lactosa, ambos al 0,5% (p/v) (GLM17); para el crecimiento rutinario de lactococos, lactobacilos, leuconostoc y estreptococos se emplearon los medios M17 suplementado con glucosa al 1% (p/v) (GM17), de Man, Rogosa y Sharpe (MRS; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), Elliker (Biokar Diagnostics, Francia) y M17 adicionado con lactosa al 1% (p/v) (LM17), respectivamente; el medio Mueller-Hinton (MH; Merck, Darmstadt, Alemania) y MH suplementado con lactosa al 1% (p/v) (MH-L) para el ensayo de resistencia a antibióticos en *L. lactis* y *S. thermophilus*; medio de fermentación para microorganismos fecales (*Fecal Fermentation Broth, FFB*) (Fooks & Gibson, 2003); y, finalmente, un medio mínimo químicamente definido (CDM; Otto et al., 1983) para los ensayos de análisis transcripcional.

Las soluciones empleadas de forma habitual para preparar las diluciones fueron: solución salina NaCl 0,9% (p/v), solución Ringer (Merck), diluyente de máxima recuperación (*Maximun Recovery Diluent, MRD*; Merck) y tampón fosfato salino (*Phosphate Saline Buffer, PBS*; Oxoid). La composición

química de los medios de cultivo y las soluciones anteriormente relacionadas se muestran en el ANEXO II.

### **3.2. Mediciones de pH, densidad bacteriana y viabilidad**

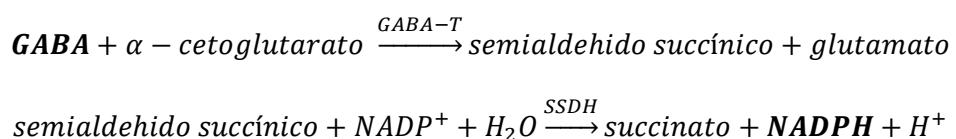
El pH de los cultivos bacterianos se midió con un pHmetro Crison (ICT, Madrid, España). El crecimiento celular se estimó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm ( $DO_{600\text{nm}}$ ) en un espectrofotómetro (Jenway Genova Bio; Madrid, España). Para la determinación de la viabilidad celular, se prepararon diluciones decimales seriadas de los cultivos en solución Ringer y, a continuación, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución por duplicado en la superficie del mismo medio de cultivo con agar (1,5% agar). Tras el inóculo, las placas de cultivo se incubaron en las condiciones óptimas para cada microrganismo (ANEXO I, Tabla 1).

### **3.3. Detección y cuantificación de GABA**

#### **3.3.1. Método enzimático de detección con GABasa**

La producción de GABA se analizó inicialmente por el método de la GABAsa según describen Tsukatani et al. (2005). Este método se basa en el cambio de absorbancia causado por la conversión de NADP<sup>+</sup> a NADPH, como consecuencia de la actividad de una mezcla de las enzimas  $\gamma$ -aminobutirato glutamato aminotransferasa y succinato semialdehído deshidrogenasa (GABase; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en presencia de GABA y  $\alpha$ -cetoglutarato. El GABA se detectó y cuantificó midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm en los cultivos bacterianos en medio MRS, GM17, LM17 o Elliker suplementados con un 1% p/v ( $\approx$ 60 mM) de glutamato monosódico (GMS; Sigma-Aldrich) después de 48 h de incubación. La producción de GABA se estimó a partir de la comparación de los valores obtenidos con las curvas de calibración construidas con concentraciones variables de GABA en los medios de cultivo y condiciones utilizados durante el ensayo (ANEXO II, Figura 1).

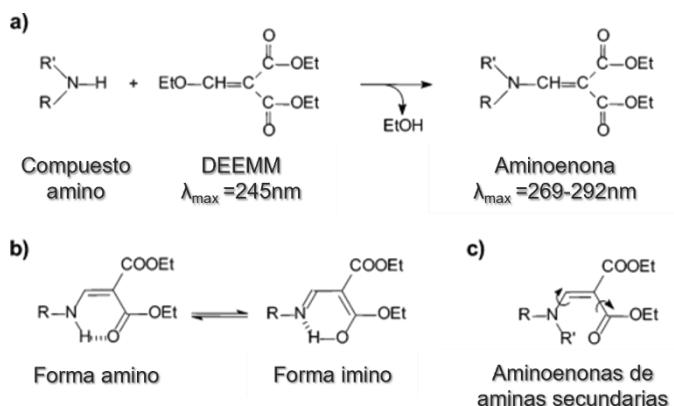
La cuantificación del GABA se basa en las reacciones siguientes:



#### **3.3.2. Método de cuantificación por cromatografía líquida de alta presión (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography*, UHPLC)**

Para la detección y cuantificación del GABA por UHPLC fue necesario hacer una derivatización previa de los sobrenadantes tras el cultivo (Figura 5), para lo cual se empleó el procedimiento de Redruello et al. (2013). De forma abreviada, se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cultivo con 175  $\mu\text{L}$  de buffer borato (ácido bórico 1 M, pH=9), 75  $\mu\text{L}$  de metanol y 3  $\mu\text{L}$  de etoximetilenmalonato de

dietilo (DEEMM), utilizando además 2 µL de ácido L-2-aminoadípico como estándar interno. La mezcla se homogenizó en un baño de ultrasonido durante 45 min a 30°C y se incubó a 70°C durante 2 h. Esta mezcla de reacción permaneció durante una noche en la oscuridad y se purificó a través de un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 µm de diámetro de poro, recogiendo el filtrado en un vial para ser inyectado al equipo de UHPLC.



**Figura 5.** Estructura de los derivados de aminoenona: a) reacción de derivatización, b) derivado de aminoácido primario y c) derivado de aminoácido secundario (Gómez-Alonso et al., 2007).

El equipo cromatográfico de UHPLC consta de un sistema H-Class Acquity (Waters, Milford, MA, EE.UU.) acoplado a un detector de fotodiodos en serie (*Photodiode Array Detector, PDA, Waters*). La separación se realizó a 35°C en una columna Waters Acquity UHPLC BEH C18 de 1,7 µm (2,1 x 100 mm). La fase móvil estuvo compuesta por tampón acetato 25 mM-pH=6,7, azida sódica al 0,02% (eluyente A), metanol (eluyente B) y acetonitrilo (eluyente C). Se trabajó con un caudal de 0,45 mL/min, eluyendo las muestras con gradiente. Los datos se adquirieron y analizaron utilizando el software Empower 2 (Waters). El GABA y su precursor GMS se identificaron por sus tiempos de retención y sus características espectrales a 280 nm, y se cuantificaron por comparación con las curvas de calibración preparadas con estándares comerciales.

### 3.4. Análisis molecular de los aislados bacterianos

#### 3.4.1. Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN total se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante del Kit Gen Elute Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich). El ADN obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización. El resultado de la extracción y purificación del ADN se comprobó en geles de agarosa al 1% (Condalab, Torrejón de Ardoz, España), utilizando como tampón de carga 1 x TAE (40 mM Tris, 20 mM acetato de etilo y 1 mM EDTA). Para el seguimiento de la electroforesis y la visualización de las bandas se utilizó EZ Vision (VWR Life Science, Radnor, Pennsylvania, EE.UU.) como agente fluorescente de unión al ADN y el marcador GRS Universal Ladder (Grisp, Oporto, Portugal) como control del tamaño

de banda del ADN. La electroforesis se realizó durante 60 min, a 75 V. El resultado se reveló con luz UV utilizando un dispositivo G Box (Syn-Gene, Cambridge, Reino Unido).

#### 3.4.2. Identificación de especies mediante secuenciación del gen 16S ARNr

Los aislados se identificaron mediante amplificación y secuenciación de una gran parte del gen que codifica el ARNr 16S utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTAC-GACTT-3'). La mezcla de reacción (50 µL) de PCR contenía 2 µL de ADN total ( $\approx$ 100 ng), 25 µL de Master Mix RED 2x (Ampliqon, Odense, Dinamarca), 1 µL de cada cebador directo y reverso (10 µM) y 21 µL de agua de grado de biología molecular (Sigma-Aldrich). Las amplificaciones se realizaron en las siguientes condiciones: un paso de desnaturización inicial a 95°C durante 5 min; 35 ciclos que incluyeron una desnaturización a 94°C durante 30 s, la unión de cebadores a 55°C durante 45 s (*annealing*) y una extensión de 72°C durante 2 min; y finalmente, un paso de extensión final de 72°C durante 10 min. El resultado de la amplificación se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v que contenían una solución de tinción de ácido nucleico y se visualizó bajo luz UV como se ha descrito anteriormente. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit GenElute PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich) y se secuenciaron en la compañía Macrogen (Madrid, España). Las secuencias se compararon con las de la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 3.4.3. Detección y secuenciación de genes *gad*

La presencia de genes *gad* se determinó mediante amplificación por PCR utilizando cebadores especie-específicos diseñados durante este trabajo. Basándose en las secuencias disponibles en las bases de datos se diseñaron cebadores para *L. lactis*, gadL-F 3'-ATGTTATACGGAAAAGAAAATC-5' y gadL-R 3'-TTAGTGAGTAAAGCCATATG-5'; para *Lpb. plantarum*, gadP-F 3'-ATGGCAATGTTACGGTAAAC-5' y gadP-R 3'-GTGTGTGAATCCGTATTCTTAG-5'; y para *S. thermophilus*, gadT-F 3'-ATGGATGAGAAGCTATTCAGAG-5' y gadT-R 3'-TTAATGATGGAAGCCGCTGCGATG-5'. La reacción de PCR se llevó a cabo en una mezcla estándar de 50 µL, y las condiciones de amplificación incluyeron un paso de desnaturización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 s (desnaturalización), 56°C durante 1 min (unión del cebador) y 72°C durante 2 min (extensión), y un paso de extensión final de 72°C durante 10 min. Tras la comprobación de la amplificación mediante electroforesis, los amplicones purificados se sometieron a secuenciación con el cebador directo en Macrogen (Laboratorios Macrogen, España). Las secuencias nucleotídicas obtenidas tras la secuenciación de los amplicones se ensamblaron y compararon entre sí y con aquellas depositadas en bases de datos. Finalmente, las secuencias de los genes *gad* se alinearon usando el programa MUSCLE (Edgar, 2004) y sus relaciones filogenéticas se calcularon usando la Prueba de Relación de Verosimilitud Aproximada (*Approximate Likelihood-Ratio*

*Test*; Anisimova y Gascuel, 2006). En el proceso de construcción de árboles filogenéticos se empleó el Coeficiente de Jaccard como medida de similitud entre conjuntos de datos para identificar patrones y relaciones entre las variables analizadas, permitiendo la generación de estructuras jerárquicas.

#### 3.4.4. Tipificación molecular de los aislados bacterianos (RAPD y rep-PCR)

La tipificación genética de los aislados se realizó empleando diversas técnicas de PCR, tales como: Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD), utilizando independientemente los cebadores M13 (5'-GAGGGTGGGCAGTTCT-3') (Rossetti & Giraffa, 2005) y OPA18 (5'-AGGTGACCGT-3') (Mättö et al., 2004); y amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (*repetitive extragenic palindromic PCR*, rep-PCR) utilizando el cebador BoxA2R (5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCBG-3') (Koeuth et al., 1995).

Las condiciones de amplificación de ADN fueron: 1 ciclo inicial de desnaturación a 95°C, durante 7 min; seguido de 40 ciclos de: desnaturación a 90°C durante 30 s; unión del cebador durante 1 min a 42°C para M13, 40°C para BoxA2R y 32°C para OPA18, y extensión a 72°C 4 min; una extensión final a 72°C durante 10 min. Los perfiles de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2,5% mediante electroforesis a 75 V durante 120 min. Los perfiles de bandas se compararon y agruparon mediante el software GeneTools v.4.03 (SynGene, Cambridge, Reino Unido) utilizando el método de agrupamiento de pares no ponderados con la media aritmética (*Unweighted Pair-Group Method with arithmetic Averages*, UPGMA). La similitud de los perfiles de amplificación se expresó a través de coeficientes de emparejamiento simple (*Simple Matching Coefficient*; SMC).

### 3.5. Evaluación de la seguridad de las cepas productoras de GABA

#### 3.5.1. Producción de aminas biogénas

La capacidad para producir aminas biogénas a partir de sus precursores, aminoácidos y compuestos derivados, se determinó tras incubar los aislados durante 48 h a temperatura óptima en medio líquido apropiado suplementado con 5 mM de tirosina, histidina, ornitina o agmatina (Sigma-Aldrich, Merck). El procesado, la detección y análisis de las muestras se realizó por UHPLC siguiendo la metodología descrita para la determinación de GABA (Redruello et al., 2013). Como controles positivos se utilizaron las cepas *Enterococcus faecalis* BA6y y *Lentilactobacillus parabuchneri* 2ES-1, productoras de tiramina e histamina, respectivamente (Ladero et al., 2015).

#### 3.5.2. Resistencia a Antibióticos

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* a 16 antibióticos se determinó por el método de microdilución en medio líquido según la norma ISO 10932:2010 (IDF, 2010), utilizando el sistema comercial Sensititre con las placas EULACBI 1 y EULACBI

2 (Thermo Scientific). Las placas Sensititre contienen diluciones seriadas dobles de los antibióticos gentamicina, kanamicina, estreptomicina, neomicina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol, ampicilina, penicilina, vancomicina, quinupristina-dalfopristina, linezolid, trimetoprima, ciprofloxacino y rifampicina.

A continuación, se describe brevemente el procedimiento empleado para este análisis. Las cepas de *L. lactis* se cultivaron en cajas de Petri con MH agar y las cepas de *S. thermophilus* con MH-L agar. Varias colonias individuales de las cepas se suspendieron en 2 mL de solución salina (NaCl al 0,9% p/v) estéril hasta obtener una densidad correspondiente al estándar 1 de McFarland ( $\approx 3 \times 10^8$  ufc/mL). Esta suspensión se diluyó 1:1000 en caldo MH o MH-L y se utilizó para inocular (con 100  $\mu$ L) cada pocillo de las microplacas con una concentración celular final de aproximadamente  $3 \times 10^5$  ufc/mL. Tras un periodo de incubación de 48 h, la CIM se definió como la concentración de antibiótico más baja a la cual no se observó crecimiento. Los valores de CIM se compararon con los puntos de corte microbiológicos reportados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA FEEDAP Panel, 2018). Según lo recomendado por EFSA, se consideró que una cepa era sensible a un determinado antibiótico cuando su CIM no superaba el punto de corte establecido en más de una dilución.

### **3.6. Caracterización bioquímica y tecnológica de las cepas productoras de GABA**

#### **3.6.1. Fermentación de carbohidratos**

Los perfiles de fermentación de carbohidratos se determinaron utilizando las galerías comerciales API50 CHL (BioMérieux, Montalieu-Vercieu, Francia). El sistema consta de tiras con pocillos que contienen 49 carbohidratos liofilizados que se rehidratan con el inóculo de la cepa en estudio en el medio de ensayo comercial sin carbohidratos. Para la inoculación, se realiza una suspensión bacteriana en 4 mL de solución salina empleando un hisopo hasta obtener una densidad celular similar al estándar 1 de McFarland. Con esta suspensión se inocularon 10 mL de medio de cultivo CHL del sistema API al 1% (v/v) de los que se adicionaron 100  $\mu$ L a cada pocillo. Estos se recubrieron con aceite de parafina para crear una tensión de oxígeno reducida. Las tiras inoculadas se incubaron a la temperatura óptima de *L. lactis* (32°C) y *S. thermophilus* (37°C) durante 24-48 h. La utilización de los azúcares se comprueba mediante el viraje de un indicador de pH incorporado al medio.

#### **3.6.2. Actividad enzimática**

La evaluación de las actividades enzimáticas de las cepas se llevó a cabo con el sistema API ZYM (BioMérieux). Para ello, se realizaron suspensiones celulares de las cepas seleccionadas en 4 mL de NaCl al 0,9% (p/v) hasta alcanzar una densidad equiparable al estándar 5-6 de McFarland. A partir de esta suspensión, se inocularon 65  $\mu$ L en cada uno de los pocillos. Las tiras se incubaron durante 4 h a

37°C. Las actividades enzimáticas se revelaron añadiendo a cada pocillo dos gotas de las soluciones ZYM A y ZYM B proporcionadas con el kit.

### 3.6.3. Actividad ureasa

La actividad ureasa de *S. thermophilus* se midió evaluando la liberación de amoniaco a partir de urea en un ensayo con rojo fenol, tal como describió Lányi (1987). A una alícuota de 0,5 mL de un cultivo de una noche (*overnight*) de cada cepa en caldo GLM17 se añadió una solución que contenía un volumen de solución A (2 g urea en 2 mL de etanol y 4 mL de agua estéril) y 19 volúmenes de solución B (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L; NaCl, 5 g/L; rojo fenol, 20 µg/mL). Esta suspensión se incubó a 37°C durante un máximo de 2 h. El desarrollo de un color rojo/violeta indica actividad ureasa.

### 3.6.4. Producción de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas se evaluó utilizando el test de difusión en agar y la cepa indicadora *Latilactobacillus sakei* CECT906<sup>T</sup>. Brevemente, los cultivos líquidos de una noche de las cepas en ensayo se centrifugaron y se filtraron a través de una membrana de 0,2 µm de diámetro de poro. El sobrenadante filtrado se neutralizó a pH=6,5, y se filtró nuevamente antes de añadirlo (50 µL) en pocillos hechos en placas de agar de MRS inoculadas al 2% con la cepa indicadora. Como control positivo, se utilizó el sobrenadante de la cepa productora de plantaricina C *Lpb. plantarum* LL441 (González et al., 1994). Como control negativo se utilizó medio de cultivo sin inocular.

### 3.6.5. Crecimiento en leche y producción de ácidos orgánicos, azúcares y volátiles (COV)

Las cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* se cultivaron en leche UHT semidescremada (CAPSA, Siero, España) a 32°C y 42°C, respectivamente, durante 24-48 h. En estos cultivos se determinó la producción de ácidos orgánicos, azúcares y compuestos orgánicos volátiles (COV).

La producción de ácidos orgánicos y azúcares residuales se determinó mediante UHPLC siguiendo el método de Alegría et al. (2016). Para ello, los compuestos se separaron en una columna de intercambio iónico ICsep ICE-ION-300 (Waltham, MA, EE.UU.) con una fase móvil de ácido sulfúrico 8,5 mM, a 65°C y una velocidad de flujo de 0,4 mL/min. Los ácidos orgánicos se identificaron con un detector de fotodiódos PAD (Waters) a 210 y 280 nm, y los azúcares con un refractómetro diferencial 410 (Waters). En ambos casos, la cuantificación se llevó a cabo mediante curvas de calibración preparadas con patrones comerciales.

La producción de COV en leche se determinó siguiendo un método de microextracción en fase sólida (SPME) seguido por cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas (GC-MS) de acuerdo con el método de Ziadi et al. (2008). Para ello, se tomaron muestras de 5 mL de leche fermentada y se colocaron en viales SPME con tapa de rosca de 20 mL (Agilent Technologies, Santa

Clara, CA, EE.UU.). Los viales cerrados se equilibraron a 60°C durante 10 min con agitación pulsada durante 5 s a 500 rpm utilizando un dispositivo automático de preparación de muestras PAL RSI 120 (CTC Analytics, Zwingen, Suiza). Los compuestos volátiles se adsorbió en una fibra ARR11-DVB-120/20 DVB/PDMS (CTC Analytics) expuesta al espacio de cabeza sobre las muestras a 60°C durante 20 min y a una profundidad de 40 mm. La fibra se introdujo en el cromatógrafo y la desorción se produjo durante 1 min a 250°C en un equipo Agilent 8890 con una columna HP-INNOWax (30m x 250um x 0,25um) (Agilent) usando el inyector en modo sin dividir (*splitless*). La temperatura del horno de columna se mantuvo a 35°C durante 0,5 min, se incrementó hasta 165°C a un ritmo de 6,5°C/min y luego hasta 260°C a 20°C/min. Como gas portador se utilizó helio a un caudal constante de 1,4 mL/min. Para la identificación se utilizó un detector de espectrómetro de masas Agilent MSD 5977B en modo cuadrupolo. La temperatura de la fuente de iones fue de 230°C y la temperatura de la interfaz de 280°C. El modo MS fue ionización electrónica a 70 eV con el rango de masas escaneado entre 35 y 250 um. El umbral para la integración individual de COV fue del 1% de la respuesta relativa. Los compuestos eluidos se identificaron en función de sus tiempos de retención y la comparación de sus espectros de masas con la base de datos Wiley Mass Spectral (Wiley and Sons, NY, EE.UU.). La cuantificación se realizó mediante cromatografía de gases empleando un detector de ionización de llama (GC-FID) (HP5890 serie II plus).

### 3.6.6. Producción de GABA en leche y heces

La producción de GABA en leche se evaluó adicionando a los cultivos 10 mM de GMS. Tras el periodo de incubación en leche en las condiciones antes mencionadas, las muestras fermentadas se sometieron a un pretratamiento ácido con HCl 0,1 M y 30 min de tratamiento con ultrasonidos siguiendo el procedimiento descrito por Fernández et al. (2007). Además, previo a la derivatización para la cuantificación de GABA por UHPLC, se realizó una dilución de la leche para que la cantidad de GABA en los cultivos se encontrara dentro del rango de cuantificación del método.

La producción de GABA en homogenizados fecales se llevó a cabo siguiendo un procedimiento descrito con anterioridad (Barret et al., 2012), utilizando el medio de fermentación fecal FFB (Fooks & Gibson, 2003) adicionado de 30 mg/mL de GMS. Después de la esterilización, el medio se dejó enfriar durante una noche a temperatura ambiente y 160 mL se transfirieron a un recipiente de fermentación. Se obtuvieron muestras fecales frescas de tres adultos sanos con las que se preparó una suspensión fecal fresca [20% (p/v)] en MRD anaeróbico que contenía 0,05% (p/v) de cisteína. El medio de fermentación anaeróbica se inoculó con 40 mL de suspensión fecal fresca en cada recipiente de fermentación. Estos medios se inocularon con cultivos de una noche (en GM17 para lactococos o LM17 estreptococos) lavados con MRD-cisteína, y se inocularon en la suspensión de fermentación fecal para dar un número inicial de células aproximado de 10<sup>8</sup> ufc/mL. Las fermentaciones se realizaron por

duplicado a 37°C durante 24 h. La detección y cuantificación de GABA se llevó a cabo tal como se ha descrito previamente.

### **3.7. Secuenciación y análisis genómico de cepas productoras de GABA**

#### **3.7.1. Secuenciación y análisis genómico**

Para la secuenciación genómica de las cepas se prepararon librerías de ADN con el kit TruSeq DNA PCR-free (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.). Las bibliotecas se secuenciaron por pares (*paired-end*) en un sistema HiSeq 1500 en la compañía Eurofins (Ebersberg, Alemania). Las lecturas obtenidas tras la secuenciación de los genomas fueron procesadas utilizando los servicios del Centro de Recursos de Bioinformática Bacteriana y Viral del NIH (BV-BRC; <https://bv-brc.org/>). Primeramente, se verificó la calidad de las lecturas con el software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) eliminando aquellas con una Q < 30 y, posteriormente se ensamblaron en cíntigos (*contigs*) utilizando el programa Unicycler (Wick et al., 2017). La calidad de los ensamblajes del genoma se evaluó con la herramienta QUAST (Gurevich et al., 2013) y los errores se corrigieron utilizando los programas informáticos Pilon (Walker et al., 2014) y Racon (Vaser et al., 2017). La anotación en BV-BRC se realizó utilizando la herramienta RASTtk. Finalmente, las secuencias de ADN y de las proteínas deducidas de las secuencias de interés específico para este trabajo, se compararon individualmente con las depositadas en la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST (BLASTn o BLASTp; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **3.7.2. Identificación genómica**

Los datos de la secuencia completa del genoma se utilizaron para confirmar la identificación de las cepas de *Lactococcus* y *Streptococcus* mediante hibridación digital de ADN-ADN (*digital DNA-DNA Hybridization*, dDDH) y análisis de identidad nucleotídica promedio (*Average Nucleotide Identity*, ANI), siguiendo la metodología descrita por Meier-Kolthoff & Göker (2019) y Yoon et al. (2017), respectivamente. En ambas técnicas, se comparó el genoma de las cepas a identificar con el de cepas tipo de otras especies evolutivamente emparentadas, siendo los umbrales de similitud actualmente aceptados de >70 % en la dDDH y >95 % en el orthoANI.

### **3.8. Efecto de distintos parámetros tecnológicos en la producción de GABA**

La producción de GABA en *S. thermophilus* St 8.1 se evaluó a diferentes tiempos de incubación, en distintas condiciones de temperatura; valores de pH; y concentraciones de azúcares, NaCl y GMS. En todos los casos, el inóculo se realizó a partir de un cultivo de una noche en LM17 al 1%, lavado y resuspendido en el medio a ensayar. Una alícuota del cultivo en cada una de las condiciones ensayadas

se centrifugó y la concentración de GABA se cuantificó por UHPLC, según la metodología descrita anteriormente.

### 3.8.1. Tiempos de incubación - Cinéticas de crecimiento

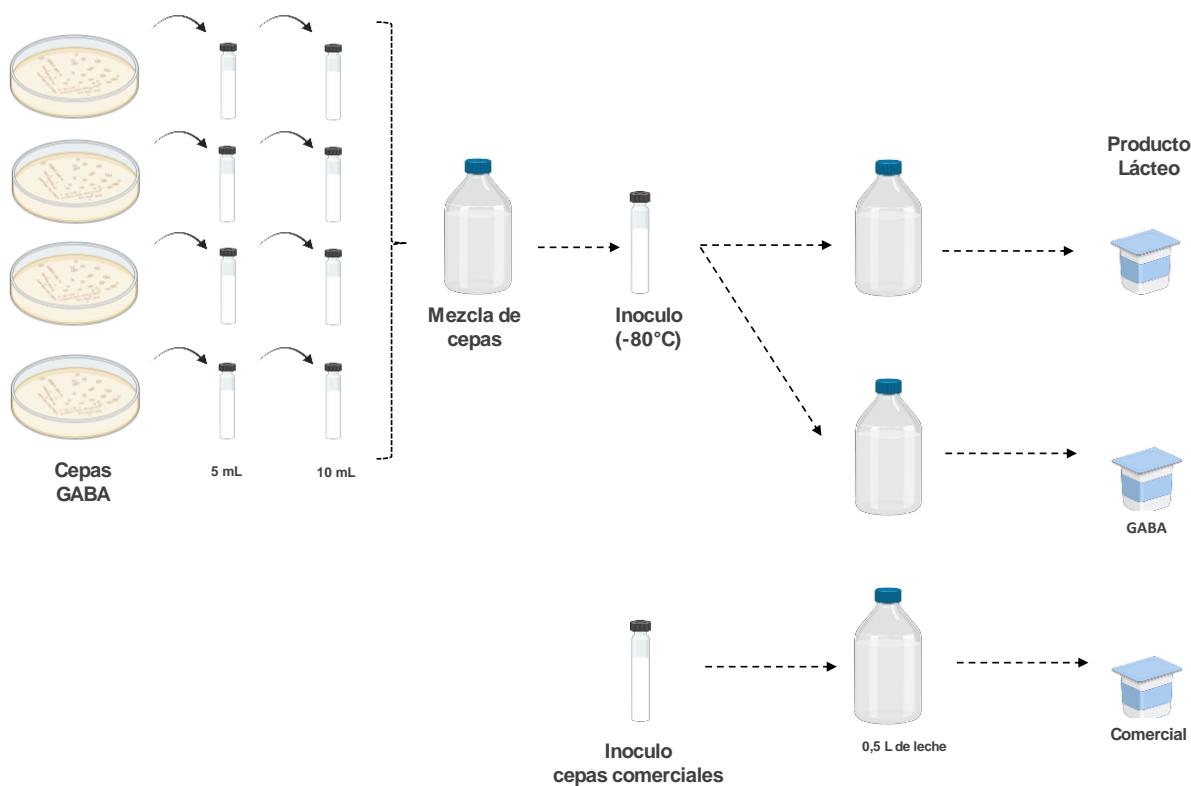
Para evaluar la producción de GABA en los medios LM17 y CDM a diferentes tiempos de incubación, se realizó el seguimiento del crecimiento de *S. thermophilus* St 8.1, sin y con el agregado de 5 mM de GMS, a 42°C, tomando muestras a los tiempos 0, 2, 4, 8, 10, 24 y 48 h. Las muestras se utilizaron también para determinar la DO<sub>600nm</sub>, el pH y el número de células viables por mililitro.

### 3.8.2. Influencia del pH, la temperatura y la concentración de azúcares, NaCl y GMS.

El efecto del pH sobre la producción de GABA se evaluó en caldo LM17 suplementado con 10 mM de GMS y ajustando el pH inicial del medio a 4,4; 5,5; 6,5 y 7,0. La influencia de distintas temperaturas (20, 32, 37 y 42°C) en la producción de GABA se evaluó en el mismo medio de cultivo, con el valor de pH inicial sin ajustar (6,9 ± 0,2 a 25°C). La influencia del sustrato azucarado en la producción de GABA se estudió en el mismo medio de cultivo, pero sin azúcares añadidos (M17), suplementado con 10 mM de GMS en ausencia de agitación, con el valor de pH inicial del medio de cultivo. Las concentraciones de los azúcares glucosa y lactosa evaluadas fueron: 0,0; 0,2; 0,5; 1,0 y 2,0%. La influencia de la concentración de sal se realizó en LM17 suplementado con GMS 10 mM en ausencia de agitación, con el valor de pH inicial del medio de cultivo y distintas concentraciones de NaCl (0,0; 0,5; 1,0 a 1,5%). Finalmente, se evaluó la influencia de la concentración de GMS también en medio LM17 y en ausencia de agitación. Las concentraciones de GMS analizadas fueron 0,0; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0 y 500,0 mM.

A excepción del ensayo en que se evaluaron distintas temperaturas, los cultivos bacterianos se incubaron en todos los casos a 42°C durante 24 h. Tras este periodo, se determinó la DO<sub>600 nm</sub>, el pH y la concentración de GABA (mM) mediante análisis cromatográfico (UHPLC), según la metodología descrita anteriormente.

### 3.9. Empleo de cultivos productores de GABA en la elaboración de productos lácteos



**Figura 6.** Preparación del inóculo y elaboración del producto lácteo.

#### 3.9.1. Elaboración de leche fermentada

Para la elaboración de la leche fermentada (Figura 6), se utilizó leche fluida semidescremada de vaca UHT (CAPSA, Siero, España). Se realizaron tres leches fermentadas, LF y LFG (inoculadas con las cepas seleccionadas productoras de GABA); y LFC (inoculada con una mezcla de cepas de *L. lactis* no productoras de GABA). Se realizó de esta manera con el fin de que al momento del análisis sensorial la apariencia de las tres leches fermentadas (LF, LFG y LFC) fueran similares entre sí. LFG se supplementó con GMS de uso alimentario (10 mM). LF y LFG se inocularon con las 4 cepas de *L. lactis* productoras de GABA seleccionadas (Lc 5.5; Lc 14.4; Lc 19.3 y Lc 21.1).

Para la preparación del inóculo, las 4 cepas seleccionadas de *L. lactis*, se recuperaron de manera individual en cajas de Petri con GM17 y se incubaron a 32°C durante 24 h. Luego de la incubación, colonias aisladas se inocularon en 5 mL de leche fresca, que se incubaron en las mismas condiciones y se utilizaron para inocular en una etapa siguiente, al 1% v/v en 10 mL de leche fresca. Tras la incubación, los cultivos de las cuatro cepas individuales se mezclaron en un recipiente estéril. La mezcla se fraccionó en tubos conteniendo 10 mL y se los llevó a congelación a -80°C. En la mezcla se determinó el número de células viables y el pH. Con esta concentración celular se realizó el cálculo del volumen necesario a agregar para que la concentración inicial en leche fuera de  $\approx 1 \times 10^6$  ufc/mL.

Finalmente, 0,5 L de leche se inoculó con el volumen necesario para iniciar la fermentación. Luego de la homogeneización, se fraccionó en recipientes plásticos con tapa (30 mL) y se incubó a 22°C durante 24 h.

A diferentes tiempos de incubación (0, 4, 10 y 24 h), se extrajeron muestras para evaluar la producción de GABA, el recuento de células viables (ufc/mL) y el valor del pH. A las 24 h, las leches fermentadas se enfriaron a 4°C, y se almacenaron a la misma temperatura durante otras 24 h antes de realizar la evaluación sensorial por un panel de consumidores.

Las muestras se almacenaron por un tiempo total de 28 días a 4°C (la vida media del yogur). Durante este tiempo se determinó la concentración de GABA, la viabilidad de los microorganismos y el pH a los 7, 14 y 28 días.

### 3.9.2. Elaboración de yogur

Para la elaboración de los yogures (Figura 6), se utilizó leche fluida semidescremada de vaca UHT (CAPSA, Siero, España). Al igual que en la leche fermentada, se realizaron tres yogures, Y e YG (inoculados con las cepas seleccionadas productoras del compuesto funcional y una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*); y un tercer yogur utilizado como control YC (inoculado con un yogur natural). El YG se supplementó con GMS de uso alimentario (10 mM). Y e YG, se inocularon con el cultivo iniciador láctico mixto contenido las 4 cepas de *S. thermophilus* productoras de GABA seleccionadas (St 8.1, St 9.1, St 18.1 y St 21.1) y una cepa de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* no productora (L 4-1).

Las cuatro cepas de *S. thermophilus* productoras seleccionadas conservadas a -80°C, se recuperaron de manera individual en cajas de Petri con medio LM17 y una cepa de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, no productora, en medio MRS, independientemente, que se incubaron durante 24 h a 42°C. Colonias aisladas se inocularon en 5 mL de leche fresca. Este cultivo se utilizó para inocular, en una etapa siguiente, 10 mL de leche fresca al 1% v/v y, tras la incubación, los cultivos de las cepas se mezclaron, y la mezcla se homogenizó, se fraccionó en tubos conteniendo 10 mL y se conservó a -80°C. Tras determinar el número de viables, la mezcla congelada se empleó para inocular leche con una concentración inicial del fermento de  $\approx 1 \times 10^6$  ufc/mL.

La producción de GABA, el pH y el recuento de viables se realizó, como en el caso anterior, a diferentes tiempos de la incubación (0, 4, 10 y 24 h) y del almacenamiento a 4°C (4, 14 y 28 días).

### 3.9.3. Evaluación sensorial

Los productos fermentados elaborados se analizaron sensorialmente por un panel de cata entrenado en la metodología de trabajo y constituido por personal del IPLA, recreando un panel de consumidores, siguiendo, en general, las recomendaciones de cata habituales (ISO, 2023).

Las muestras se codificaron con tres dígitos aleatorios y el panel de consumidores valoró los atributos de aspecto, aroma, textura y sabor; estos atributos se seleccionaron en función de la Norma ISO 22935-2 | IDF 99-2: 2023 y -aceptación global (Ver plantilla en Anexo IV). Todos estos descriptores se evaluaron empleando una escala hedónica lineal de 5 puntos, siendo 1 (no me gusta nada) y 5 (me gusta mucho). Los resultados se analizaron de forma estadística usando el programa Infostat (Versión 2020. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina), que utiliza los valores medios ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar (DS) para examinar las diferencias entre los grupos de estudio. Además, tras la degustación se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para identificar posibles variaciones significativas entre las variables analizadas.

## 3.10. Análisis transcripcional del operón GAD de *S. thermophilus* St 8.1

### 3.10.1. Condiciones de cultivo bacteriano

Para el análisis de la expresión génica, la cepa *S. thermophilus* St. 8.1 se cultivó en un medio químicamente definido (CDM) descrito previamente por Otto et al. (1983), con las siguientes modificaciones: el hidrolizado de caseína se sustituyó por una solución que contenía los 19 aminoácidos esenciales (excepto el glutamato) a 0,2 g/L; la concentración de lactosa se incrementó hasta 5 g/L; y, por último, se añadieron las siguientes sales: 0,01 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,16 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,24 g de  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  y 1 g de  $\text{C}_2\text{H}_2\text{NaO}_2$  por litro. Para la producción de GABA, se añadió una concentración de 5 o 10 mM de GMS a los medios LM17 ( $\text{LM17}_{\text{GMS}}$ ) y CDM ( $\text{CDM}_{\text{GMS}}$ ). Para estudiar el efecto del NaCl (1%) y la lactosa (2%) sobre la expresión de los genes *gadB* y *gadC* y, por ende, sobre la producción de GABA se analizaron las siguientes condiciones de cultivo: (C1), CDM; (C2),  $\text{CDM}_{\text{GMS}}$ ; (C3),  $\text{CDM}_{\text{GMS}}$  suplementado con NaCl al 1%; y (C4),  $\text{CDM}_{\text{GMS}}$  suplementado con lactosa al 2%. Estos cultivos se inocularon al 1% con un cultivo nocturno de St 8.1 en CDM y se cultivaron a 42°C durante 24 h sin agitación.

### 3.10.2. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNC

El ARN total se aisló a partir de dos réplicas biológicas independientes de cultivos de *S. thermophilus* St 8.1 en las condiciones descritas. Después de la incubación, se centrifugó el cultivo, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se lavó con PBS y se suspendió en una solución que contenía 0,5 mL de PBS y 1 mL de ARN protector (Qiagen, Hilden, Alemania). Las suspensiones celulares se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min, se centrifugaron a  $5.000 \times g$  durante

10 min y se almacenaron a -80°C hasta la extracción del ARN. Las muestras congeladas se descongelaron y las células se homogeneizaron en 350 µL de solución RLT (Qiagen) adicionada de β-mercaptoetanol (1:100 v/v), 500 µL de fenol ácido:cloroformo (1:1), 50 µL de SDS al 10% y perlas de vidrio (Sigma-Aldrich). Las células se rompieron mecánicamente utilizando un equipo FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, Thermo Fisher Scientific). Después de la lisis, el ARN se purificó utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para eliminar probable ADN contaminante, el ARN recuperado se trató con el reactivo Turbo DNase (Ambion, Thermo Fisher Scientific). La ausencia de trazas de ADN en las muestras de ARN se confirmó mediante qPCR utilizando los cebadores bacterianos universales TBA-F y TBA-R (Denman & McSweeney, 2006), que amplifican el gen que codifica el ARNr 16S. Para el almacenamiento, al ARN purificado (50 µL) se añadió 1 µL de inhibidor de RNase SUPERase•In (Ambion). La concentración de ARN se determinó utilizando el kit de ensayo ARN HS (Thermo Fisher Scientific) y un fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific).

A partir de 0,25 µg de ARN se sintetizó el ADN complementario (ADNc) utilizando el kit iScript™ Reverse Transcription Supermix (BioRad, Barcelona, España), siguiendo las recomendaciones del fabricante: un ciclo de 25°C durante 5 minutos, 42°C durante 30 minutos y 85°C durante 5 minutos. El ADNc resultante se conservó a -20°C hasta su uso como ADN molde en los análisis cuantitativos de expresión génica.

### 3.10.3. Cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR

La expresión de los genes *gadB* y *gadC* de *S. thermophilus* St 8.1 cultivado en diferentes condiciones se cuantificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR) utilizando un termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, EE. UU.) y la mezcla SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). El análisis se llevó a cabo por duplicado. A partir de la secuencia genómica de *S. thermophilus* St 8.1, se diseñaron cebadores específicos dirigidos a los genes *gad* y cebadores que amplifican regiones de genes conservados (*housekeeping*) (Tabla 1), utilizando los algoritmos proporcionados por el software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). La eficiencia de amplificación para cada par de cebadores se calculó en función de la pendiente de la curva estándar obtenida después de utilizar diluciones decimales de ADN de *S. thermophilus* St 8.1 como molde en amplificaciones de qPCR. Además, se analizaron las curvas de disociación para confirmar la presencia de un solo pico, lo que indica la especificidad de amplificación de los cebadores.

**Tabla 1.** Eficiencia de amplificación de los cebadores para GABA y genes de mantenimiento en este estudio y ecuaciones de regresión para el análisis RT-qPCR.

| Proteína  | Gen          | Secuencia de cebadores<br>(5'- 3') | Ecuación de regresión   | Eficiencia (%) | Referencia             |
|---|--------------|------------------------------------|-------------------------|----------------|------------------------|
| Glutamato/gamma-aminobutirato antiportador                    | <i>gadC</i>  | TCGGTTTGATTGCATGTGTT               | $y = -3,5083x + 27,930$ | 92,76          | Este trabajo           |
|   |              | CACCACTGCCAAGACCCTAA               |                         |                |                        |
| Glutamato descarboxilasa                                      | <i>gadB</i>  | TATTCCGGTGTGCTTGGAA                | $y = -3,5767x + 28,853$ | 90,36          | Este trabajo           |
|   |              | AACCAGCCTTCATCCGTAAC               |                         |                |                        |
| Gliceraldehído-3-fosfatasa deshidrogenasa dependiente de NADP | <i>GADPH</i> | TCACAGGACGTGGTCAGTT                | $y = -3,8613x + 29,511$ | 81,54          | Este trabajo           |
|   |              | AAGCATTACTGGACGCATTG               |                         |                |                        |
| Subunidad $\beta$ de glicina-ARNt ligasa                      | <i>glyS</i>  | TCAAACCTTCTAACACCTCG               | $y = -3,9110x + 30,163$ | 80,17          | Xiong et al.<br>(2020) |
|   |              | AGTTTCCATCACGATCCAAGG              |                         |                |                        |

Las amplificaciones de RT-qPCR para cada muestra se realizaron por triplicado en un volumen final de 20  $\mu$ L que contenía 10  $\mu$ L de 2xSYBR Green Master Mix que incluía ROX como referencia pasiva (Applied Biosystems), 900 nM de cada cebador y 2  $\mu$ L de ADN molde (5-10 ng). Los valores del ciclo umbral (*cycle threshold*, Ct) se calcularon automáticamente mediante el Software 7.500 v.2.0.4 (Applied Biosystems). El nivel de expresión relativa de los genes *gad* se calculó siguiendo el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando los datos de amplificación de los genes control para normalizar la concentración de ADNc de las muestras, y los datos de amplificación obtenidos en la condición de crecimiento C1 (medio de cultivo CDM) como referencia (calibrador).



# Resultados y discusión





## 4. Resultados y Discusión

### Capítulo 1.- Identificación y selección de cepas de bacterias lácticas productoras de GABA

Las cepas de BAL productoras de GABA podrían ser utilizadas para la elaboración de productos lácteos enriquecidos en este compuesto que promuevan beneficios para la salud del consumidor. En este capítulo se detalla el cribado realizado en una amplia colección de aislados de BAL, con el objetivo de identificar cepas productoras de GABA.

#### 4.1. Evaluación de la capacidad de producir GABA en aislados de BAL

##### 4.1.1. BAL aisladas de quesos y productos lácteos fermentados

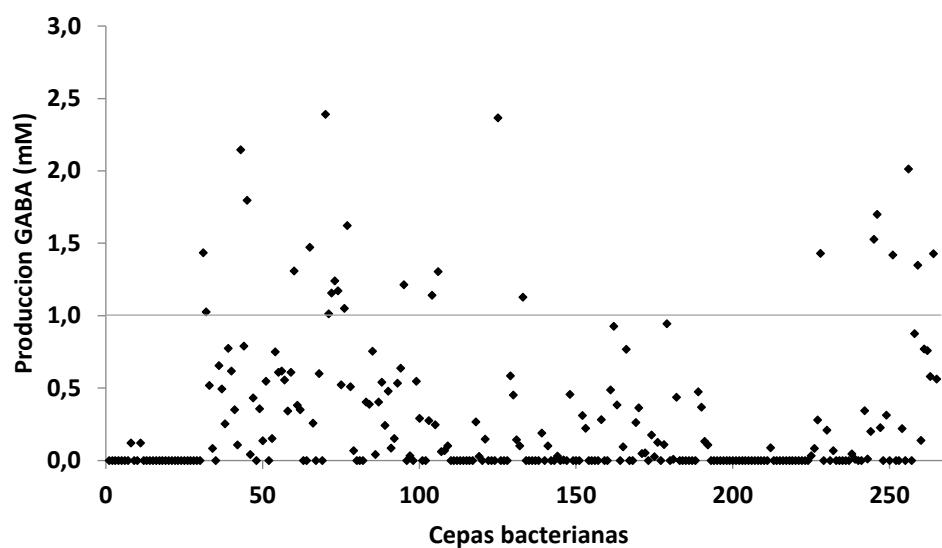
La capacidad de producción de GABA se evaluó inicialmente en un conjunto de 262 cepas de BAL, aisladas de productos lácteos fermentados, pertenecientes a diversos géneros y especies, predominantemente *L. lactis* (125), *S. thermophilus* (39), lactobacilos (55) y *Leuconostoc* spp. (15) (ANEXO I, Tabla 1). Estas cepas se aislaron e identificaron en trabajos previos y procedían de una amplia variedad de productos lácteos fermentados, tales como quesos, yogures, leches fermentadas y kéfir, elaborados artesanalmente utilizando leche cruda y sin la adición de cultivos iniciadores. La diversidad de las bacterias lácticas para un buen número de características fenotípicas está bien reconocida (Carr et al., 2002), de manera que, dada la amplia colección disponible para este trabajo, se esperó encontrar una diversidad de cepas productoras.

##### Obtención de las rectas de calibración

Para determinar la cantidad de GABA producida por las cepas seleccionadas para el estudio se utilizó inicialmente la metodología de la GABasa. Para ello, en primer lugar, se construyeron curvas de calibración independientes y específicas para cada medio cultivo (M17, Elliker y MRS) adicionado de distintas concentraciones de GABA (ANEXO III, Figura 1). Las absorbancias de los medios de cultivo M17 y Elliker fueron muy similares entre sí. Sin embargo, en el medio MRS fue siempre menor que en los otros dos.

Los resultados obtenidos para las cepas analizadas se muestran esquematizados en la Figura 2. En las condiciones ensayadas, la cantidad de GABA producida por las diferentes cepas de las distintas especies varió ampliamente, entre 0,00 y 2,61 mM. Esta variabilidad en el fenotipo “productor de GABA” se reportó previamente para otras BAL aisladas también de productos lácteos tradicionales (Siragusa et al., 2007; Diana et al., 2014; Franciosi et al., 2015; Renes et al., 2017). Entre las cepas ensayadas en este trabajo, 123 cepas produjeron cantidades detectables de GABA y únicamente 24 cepas generaron más de 1mM de GABA (equivalente a 103,12 mg/L; Figura 7). La concentración de GABA producido por estas cepas y evaluado mediante el método enzimático de la GABasa se presenta

en la Tabla 2. Los mayores niveles de producción de GABA se detectaron en los cultivos de *Lvb. brevis* LMG 6906. Cepas de esta especie procedentes de diferentes fuentes se describieron repetidamente como grandes productoras de GABA (Siragusa et al., 2007; Li et al., 2008; Wu y Shah, 2017). La mayoría de las cepas productoras identificadas en este trabajo, se correspondieron con las especies *L. lactis* (16) y *S. thermophilus* (3). De forma más específica, las cepas más productoras resultaron ser *L. lactis* subsp. *lactis* L LAC 39, *L. lactis* subsp. *lactis* L LAC 13 y *Lcb. casei* L PAR 17, con niveles de producción ( $\approx 2,5\text{mM}$ ), similares a los de la cepa utilizada como control positivo: *Lvb. brevis* LMG 6906 (Tabla 2). Cabe destacar que todas las cepas de *Lactococcus* productoras de GABA pertenecían a la especie *L. lactis*, ya que, bajo las condiciones de ensayo, ninguna de las 33 cepas de *L. cremoris* produjo GABA.



**Tabla 2.** Cepas seleccionadas que presentan mayor producción de GABA en medio de cultivo con GMS como precursor.

| Especie  | Cepas     | Condiciones de cultivo | Producción de GABA (mM)           |                   | Gen<br>gad |
|--|-----------|------------------------|-----------------------------------|-------------------|------------|
|  |           |                        | Método<br>enzimático <sup>1</sup> | HPLC <sup>2</sup> |            |
| <i>Levilactobacillus brevis</i>                | LMG 6906  | MRS/32°C/aerobiosis    | 2,81                              | 2,60              | ne         |
| <i>Lactobacillus gasseri</i>                   | LMG 9203  | MRS/32°C/aerobiosis    | 1,35                              | 0,10              | ne         |
| <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>            | L PAR 17  | MRS/32°C/aerobiosis    | 2,37                              | 0,13              | ne         |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>           | LL 441    | MRS/32°C/aerobiosis    | 1,42                              | 0,18              | +          |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | L LAC 1   | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,43                              | 0,59              | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 2   | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,93                              | 0,53              | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 13  | GM17/32°C/aerobiosis   | 2,15                              | -                 | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 15  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,80                              | 0,95              | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 30  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,31                              | -                 | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 35  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,47                              | 0,65              | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 39  | GM17/32°C/aerobiosis   | 2,39                              | -                 | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 41  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,01                              | -                 | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 42  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,16                              | 0,30              | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 43  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,24                              | 0,49              | -          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 44  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,17                              | -                 | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 46  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,05                              | 0,23              | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 47  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,62                              | 0,21              | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 66  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,21                              | -                 | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 73  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,14                              | 0,51              | +          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>          | L LAC 75  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,30                              | 0,45              | +          |
| <i>Leuconostoc lactis</i>                      | LEU LAC 1 | MRS/32°C/aerobiosis    | 1,13                              | -                 | ne         |
| <i>Streptococcus thermophilus</i>              | S-THEF9.1 | LM17/37°C/anaerobiosis | 1,53                              | 0,18              | +          |
| <i>S. thermophilus</i>                         | S-THEF9.2 | LM17/37°C/anaerobiosis | 1,70                              | -                 | +          |
| <i>S. thermophilus</i>                         | St 10     | LM17/37°C/anaerobiosis | 1,43                              | -                 | +          |

<sup>1</sup> Producción de GABA en medio líquido suplementado con 1% (p/v) de GMS.<sup>2</sup> Producción de GABA en medio líquido suplementado con 5 mM de GMS.

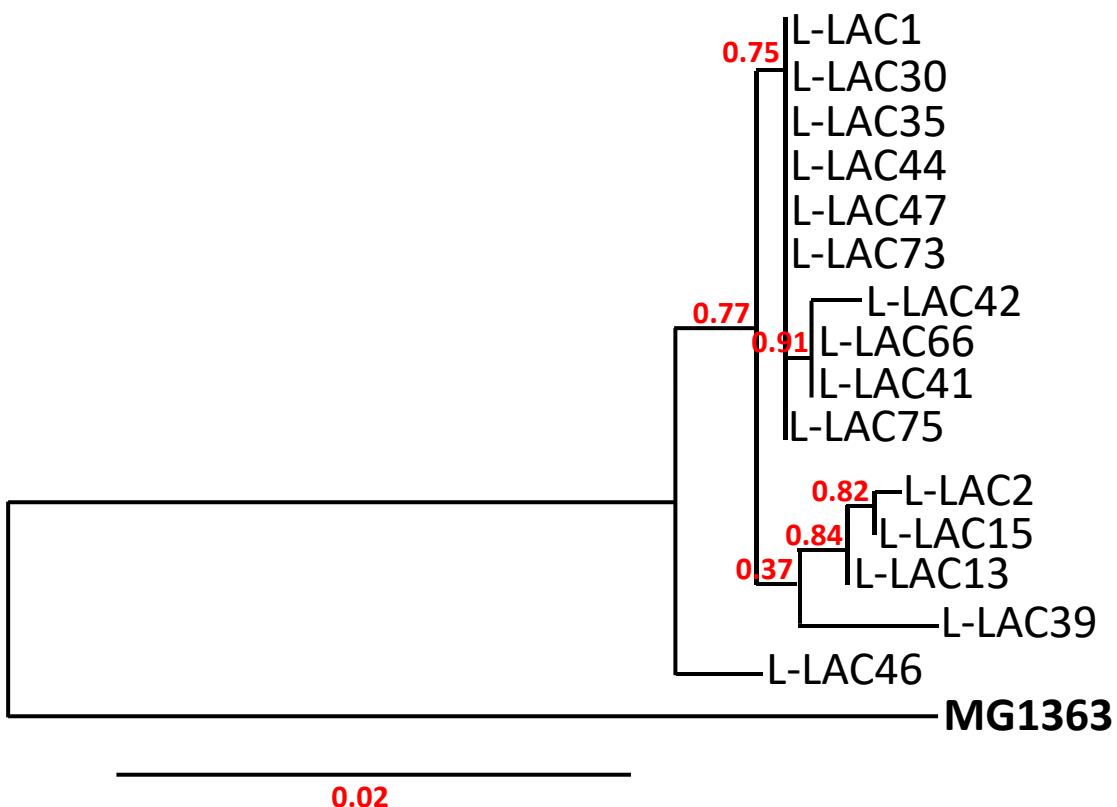
ne: no examinado

La distinta concentración de GMS utilizada como precursor en los ensayos ( $\approx$ 60mM en el método de la GABasa y 5mM en el método de UHPLC), así como la pérdida del compuesto asociado a los procesos de extracción y derivatización requeridos para el análisis cromatográfico, podrían

influenciar en estas diferencias observadas entre ambas metodologías. En todo caso, el método cromatográfico se considera más exacto y preciso (Redruello et al., 2013), por lo que los resultados de esta metodología fueron los que se consideraron finalmente para la selección de cepas.

En las condiciones de ensayo y con la cantidad de precursor indicada de 5 mM, ninguna de las cepas de la colección mostró valores de GABA > 1 mM. Comparando estos resultados con los de otros estudios (Linares et al., 2016; Renes et al., 2017), en este trabajo no se detectaron cepas sobreproductoras de GABA y todas las cepas se consideraron productoras moderadas. Sin embargo, los resultados obtenidos concuerdan bien con las cantidades habituales de GABA reportadas por diversas especies de BAL de origen lácteo (Siragusa et al., 2007; Dhakal et al., 2012; Franciosi et al., 2015). La optimización de la constitución del medio y las condiciones de cultivo, podrían contribuir a incrementar la producción de GABA, tal como se describió en forma reciente (Pannerchelvan et al., 2023).

La presencia de gen *gad* que codifica la descarboxilasa en las cepas seleccionadas, se examinó mediante PCR utilizando cebadores especie-específicos, diseñados en este trabajo en base a las secuencias disponibles en las bases de datos para las especies *L. lactis*, *S. thermophilus* y *Lpb. plantarum*. Cabe mencionar que las cepas de las especies *Lvb. brevis*, *Lb. gasseri*, *Lcb. paracasei* y *Ln. lactis* no fueron analizadas; puesto que, *Lvb. brevis* se estudió ampliamente y por otro lado no hay secuencias de genes *gad* disponibles para el resto de las especies mencionadas. La producción de GABA se correlacionó positivamente con la presencia de genes *gad*, ya que, con esta metodología, se obtuvo amplificación positiva para todas las cepas analizadas, con la excepción de *L. lactis* L LAC43 (Tabla 2). La ausencia de amplificación, sugiere que esta cepa podría presentar heterogeneidad de secuencia que, de alguna forma, difiera de la de los cebadores utilizados. Se describieron varios tipos de genes que codifican GAD en especies BAL de diferentes orígenes (Nomura et al., 2000; Somkuti et al., 2012; Yunes et al., 2016). Por lo tanto, no se puede descartar la presencia en L LAC43 de un gen como el de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (número de acceso al GenBank KF751353.2), que se relaciona con los encontrados en *Lpb. plantarum* y algunos *S. thermophilus*.

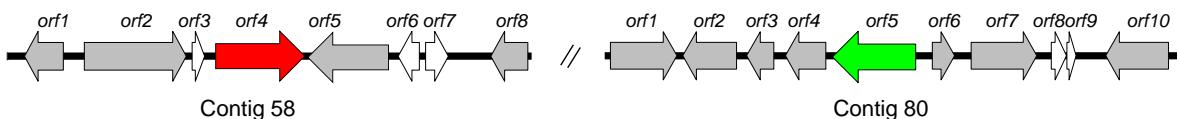


**Figura 8.** Árbol filogenético basado en las secuencias de un segmento interno (1.238 pb de largo) de los diferentes genes que codifican la enzima glutamato descarboxilasa de las cepas de *Lactococcus lactis* analizadas en este estudio. La secuencia de *Lactococcus cremoris* MG 1363 (n.º de acceso de GenBank AM406671.1; etiqueta de locus llmg\_1179) se utilizó como comparador. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones por secuencia.

Los amplicones obtenidos se secuenciaron, comparando las secuencias entre sí y con las de otras cepas caracterizadas por diversos autores presentes en las bases de datos públicas. Las secuencias de los genes de las tres cepas de *S. thermophilus* (de 1260 pb) resultaron ser idénticas y muy similares a otras de la misma especie (Gu et al., 2022). Por el contrario, se observó una heterogeneidad moderada en las secuencias de los genes de las diferentes cepas de *L. lactis*, incluyendo sustituciones de nucleótidos en 22 posiciones de un segmento de 1.238 pb (del total de 1.398 pb del gen *gad* completo de esta especie). Las relaciones filogenéticas de los segmentos secuenciados del gen *gad* en 15 cepas de *L. lactis* se muestran en la Figura 8. Esta heterogeneidad nucleotídica podría contribuir a las diferencias en la actividad enzimática de GAD y, por tanto, en la producción de GABA. El operón *gad* se detectó también en cepas de *L. cremoris* (Laroute et al., 2023), pero frecuentemente se encuentra inactivo por mutaciones en alguno de los genes, lo que explicaría la ausencia de cepas productoras de esta especie en este trabajo.

La disponibilidad de las secuencias del genoma de dos cepas productoras de GABA, *Lpb. plantarum* LL441 (LWKN00000000) y *S. thermophilus* St-10 (PHHG00000000), permitió inspeccionar de manera minuciosa la arquitectura del gen *gad* que codifica la descarboxilasa (*gadB*)

en estas cepas y analizar su contexto genético circundante (Figura 9). Los resultados indicaron que la organización genética del operón *gad* en *Lpb. plantarum* LL441 se asemeja a la reportada para otras cepas de la misma especie (Park y Oh, 2004), mientras que la organización en *S. thermophilus* St-10 parece ser muy similar a la reportada para otras cepas de esta especie (Somkuti et al., 2012; Sun et al., 2022). La secuencia completa de 1.407 pb del gen *gadB* de *Lpb. plantarum* LL441 (etiqueta de *locus* A6B36\_04600) mostró un solo cambio sinónimo de nucleótido en comparación con la de *Lpb. plantarum* HFC8 (ID de secuencia CP012650.1), siendo muy similar a la de *Lpb. plantarum* KACC 92189 (CP024058.1), SK151 (CP030105.1), AS-8 (CP028422.1) entre muchos otros. En un cónigo de LL441 diferente al que alberga el gen *gadB*, se identificó un gen que codifica una supuesta proteína transportadora de la familia glutamato/gamma-aminobutirato de tipo YjeM (etiqueta de *locus* A6B36\_06260) (Figura 9.A; contigo 80). Esta proteína podría ser el intercambiador (*antiporter*) responsable de la incorporación de glutámico y de la exportación del GABA. De manera similar, el gen *gadB* de *S. thermophilus* St-10 (etiqueta de *locus* CV716\_08690) mostró solo dos nucleótidos similares con las secuencias de las cepas *S. thermophilus* GABA (CP025399.1), APC191 (CP019935.1) y ND03 (CP002340.1). En la cepa St-10, el operón GABA (*gadBC*) está ubicado aguas abajo del gen que codifica la S-ribosilhomocisteína liasa (*LuxS*) y flanqueado por genes que codifican secuencias similares a las transposas IS1216 (aguas arriba) y Tn1546 (aguas abajo) (Figura 9.B; contigo 25). El gen *gadC*, que codifica el antiportador de glutamato/gamma-aminobutirato, está situado inmediatamente aguas abajo de *gadB* (etiqueta de *locus* CV716\_08695).

**A) *Lactiplantibacillus plantarum* LL441**

*orf1*- Regulador de la transcripción, familia TetR  
*orf2*- Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP)

*orf3*- Proteína hipotética

*orf4*- Glutamato descarboxilasa (*gadB*, *GAD*)

*orf5*- Muropeptidasa de gamma-D-glutamato-meso-diaminopimelato

*orf6*- Proteína hipotética

*orf7*- Proteína hipotética

*orf8*- Proteína de membrana integral

*orf1*- Aminohidrolasa/peptidasa, familia M20D

*orf2*- Deshidrogenasa/oxidoreductasa de cadena corta, familia SDR

*orf3*- Policétido ciclasa/deshidrasa y transporte de lípidos

*orf4*- Regulador de la transcripción, familia Xre

*orf5*- Transportador de la familia de glutamato/gamma-aminobutirato *YjeM*

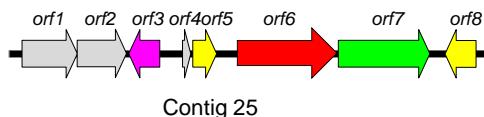
*orf6*- Transglucosilasa

*orf7*- 1,3-propanodiol deshidrogenasa

*orf8*- Proteína hipotética

*orf9*- Proteína hipotética

*orf10*- Alcohol arílico deshidrogenasa

**B) *Streptococcus thermophilus* St-10**

*orf1*- Cadena beta de la acetil-coenzima A carboxiltransferasa

*orf2*- Cadena alfa de la acetil-coenzima A carboxiltransferasa

*orf3*- Proteína productora de S-ribosilhomocisteína liasa/Autoinductor-2 LuxS

*orf4*- Sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad de especificidad S

*orf5*- Transposasa para el elemento similar a la secuencia de inserción *IS1216*

*orf6*- Glutamato descarboxilasa (*gadB*, *GAD*)

*orf7*- Antiportador de glutamato/gamma-aminobutirato (*gadC*)

*orf8*- Transposasa para transposición *Tn1546*

**Figura 9.** Análisis genómico del loci del operón GAD involucrado en la síntesis del GABA en (A) *Lactiplantibacillus plantarum* LL441 (n.º de acceso de GenBank LWKN00000000) y (B) *Streptococcus thermophilus* St-10 (n.º de acceso de GenBank PHHG00000000), incluido el gen GAD (*gadB*) y su antiportador de glutamato/gamma-aminobutirato asociado (*gadC*).

#### 4.1.2. BAL aisladas de muestras de leche cruda

La pequeña producción de GABA de las cepas analizadas en comparación con la superproducción reportada en otros trabajos (Linares et al., 2016; Renes et al., 2017), podría deberse a una reducida capacidad de producción intrínseca (poca expresión génica, reducida actividad enzimática), lo cual sugiere la posibilidad de que el análisis de más variedades o de aquellas provenientes de otros ambientes pudiera permitir identificar cepas con mayor capacidad de producción. Con este objetivo, se realizaron nuevos aislados de BAL mesófilas y termófilas a partir de muestras de leche cruda, un ambiente del cual no se contaba con representantes para el análisis anterior.

Para ello, 24 muestras de leche procedentes de toda la geografía regional de Asturias, España, se muestearon para recuperar aislados de *Lactococcus* spp. y *S. thermophilus*, utilizando diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación (GM17 a 32°C y LM17 a 42°C, respectivamente). A partir de los crecimientos provenientes de cada muestra de leche, se tomaron 5 colonias por cada condición de cultivo, se purificaron en el mismo medio de aislamiento y se identificaron por métodos moleculares mediante la amplificación, secuenciación y comparación del gen que codifica el ARNr 16S. De esta manera, se identificaron un total de 236 aislados: 119 mesófilos y 117 termófilos (cuatro aislados se perdieron durante el proceso de purificación). De los 119 aislados mesófilos, 26 se

identificaron como *L. lactis*, y de los 117 aislados termófilos, 49 como *S. thermophilus*. Para excluir replicados y dado que se aislaron cepas de las dos especies de las muestras de leche analizadas, se seleccionaron una cepa mesófila y una termófila de cada muestra.

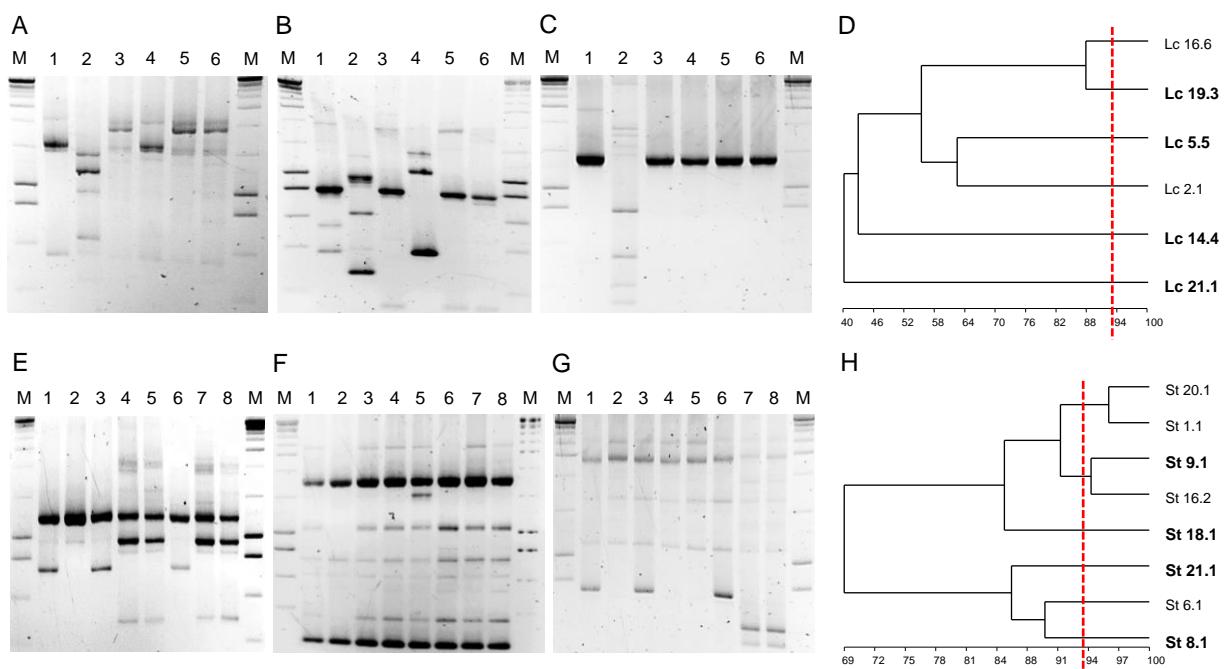
La capacidad de producción de GABA de estas 48 cepas (24 de cada especie) se ensayó en medio líquido GM17 y LM17, y la producción se evaluó mediante el análisis de UHPLC descrito anteriormente, utilizando una concentración del precursor de 5,0 mM. En 20 de los 48 cultivos bacterianos analizados se detectó una concentración de GABA superior a 0,64 mM: la cantidad mínima para que una cepa se considere positiva, siguiendo las recomendaciones de Redruello et al. (2013). A partir de éstas, se seleccionaron 14 cepas, 6 de la especie *L. lactis* y 8 de la especie *S. thermophilus* (Tabla 3). Cabe señalar que todas las cepas “nuevas” parecían producir cantidades de GABA superiores a las de las cepas analizadas con anterioridad. Esto podría deberse a los cambios que se introdujeron en este periodo en el procesado de las muestras o en el método de derivatización.

**Tabla 3.** Producción de GABA (mM) de aislados de leche cruda en medio de cultivo adicionado del precursor GMS 10 mM.

| Especie  | Cepas          | Condiciones de cultivo | Producción<br>de GABA<br>(mM) |
|--|----------------|------------------------|-------------------------------|
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <b>Lc 2.1</b>  | GM17/32°C/aerobiosis   | 1,56                          |
| <i>L. lactis</i>                               | <b>Lc 5.5</b>  | GM17/32°C/aerobiosis   | 4,88                          |
| <i>L. lactis</i>                               | <b>Lc 14.4</b> | GM17/32°C/aerobiosis   | 5,05                          |
| <i>L. lactis</i>                               | <b>Lc 16.6</b> | GM17/32°C/aerobiosis   | 4,24                          |
| <i>L. lactis</i>                               | <b>Lc 19.3</b> | GM17/32°C/aerobiosis   | 4,55                          |
| <i>L. lactis</i>                               | <b>Lc 21.1</b> | GM17/32°C/aerobiosis   | 6,29                          |
| <i>Streptococcus thermophilus</i>              | <b>St 1.1</b>  | LM17/37°C/anaerobiosis | 2,84                          |
| <i>S. thermophilus</i>                         | <b>St 6.1</b>  | LM17/37°C/anaerobiosis | 1,09                          |
| <i>S. thermophilus</i>                         | <b>St 8.1</b>  | LM17/37°C/anaerobiosis | 4,51                          |
| <i>S. thermophilus</i>                         | <b>St 9.1</b>  | LM17/37°C/anaerobiosis | 3,95                          |
| <i>S. thermophilus</i>                         | <b>St 16.1</b> | LM17/37°C/anaerobiosis | 3,75                          |
| <i>S. thermophilus</i>                         | <b>St 18.1</b> | LM17/37°C/anaerobiosis | 4,19                          |
| <i>S. thermophilus</i>                         | <b>St 20.1</b> | LM17/37°C/anaerobiosis | 2,77                          |
| <i>S. thermophilus</i>                         | <b>St 21.1</b> | LM17/37°C/anaerobiosis | 3,90                          |

#### 4.2. Tipificación de los aislados de BAL con mayor producción de GABA

A pesar de que los 14 aislados que produjeron mayor cantidad de GABA que procedían de muestras de leche distintas, pudiendo considerarse, en principio, como cepas distintas, se llevó a cabo una tipificación molecular con el objetivo de seleccionar las cepas con menor parentesco genético. Para ello, se utilizó un procedimiento estandarizado que combina los perfiles de amplificación obtenidos de forma independiente con tres oligonucleótidos distintos: M13, BoxA2R y OPA18. Los resultados de las amplificaciones y la agrupación de los perfiles mediante el método UPGMA se muestran en la Figura 10.



**Figura 10.** Perfiles de tipificación mediante RAPD y rep-PCR de cepas de *Lactococcus lactis* (A, B, C) y *Streptococcus thermophilus* (E, F, G) obtenidos con los cebadores M13 (A, E), BoxA2R (B, F) y OPA18 (C, G), y dendrograma de similitud (D, H) de los perfiles de tipificación combinados expresados por el coeficiente de similitud de Jaccard (en %). La agrupación se realizó mediante el método de grupos de pares no ponderados utilizando promedios aritméticos (UPGMA). La línea roja marca la repetibilidad del método (93%). En negrita, cepas sometidas a secuenciación genómica.

Considerando la reproducibilidad del método (aproximadamente 93%), los resultados sugieren la presencia de seis cepas distintas de cada especie (Figura 10). Dado que en la caracterización de las cepas se contempló la secuenciación y el análisis genómico, tal como se desarrolla en capítulos posteriores, se realizó una nueva selección utilizando el criterio de distancia genética, para finalmente seleccionar cuatro cepas de cada especie: *L. lactis* (Lc 5.5, Lc 14.4, Lc 19.3 y Lc 21.1) y *S. thermophilus* (St 8.1, St 9.1, St 18.1 y St 21.1). Para que estas cepas puedan utilizarse como fermentos o adjuntos en la elaboración de productos lácteos fermentados con características funcionales, es necesario determinar sus propiedades bioquímicas y tecnológicas y asegurar su inocuidad (EFSA FEEDAP Panel,

2018). Por ello, estas 8 cepas seleccionadas se sometieron a un conjunto de pruebas bioquímicas y genéticas tal como se describe en los siguientes apartados.

### Conclusión parcial

Se estudió la producción de GABA de 310 aislados procedentes de leche y productos lácteos tradicionales de diversos orígenes, elaborados con leche cruda y sin cultivos iniciadores. En 262 aislados, se evaluó inicialmente, en medios de cultivo suplementados con GMS al 1% utilizando el método enzimático de la GABasa. Posteriormente, de las 24 cepas con mayor producción según esta metodología, se confirmó en medios de cultivo con 5 mM de GMS y se cuantificó mediante UHPLC, al igual que la producción de las 48 cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* procedentes de leche cruda.

Una gran parte de los aislados pertenecían a las especies *L. lactis* (182 aislados) y *S. thermophilus* (63 aislados). La producción de GABA por estos aislados fluctuó entre 1,01 y 6,29 mM. *L. lactis* y *S. thermophilus* son, sin duda, las especies de BAL más importantes económicamente ya que se utilizan en todo el mundo como fermentos en la elaboración, respectivamente, de queso y yogur. Por este motivo, para los trabajos posteriores, se seleccionaron 8 cepas, 4 de cada especie, para su completa caracterización, lo que incluyó aspectos bioquímicos, genéticos, tecnológicos y de seguridad alimentaria.



## Capítulo 2.- Caracterización fenotípica y genómica de cepas de BAL productoras de GABA

Los cultivos iniciadores y de maduración constituidos por BAL productoras de GABA podrían utilizarse en el desarrollo de alimentos fermentados funcionales con un potencial efecto beneficioso para la salud del consumidor. Antes de su introducción en la cadena alimentaria, dichos cultivos bacterianos deberían ser sometidos a una completa caracterización funcional, tecnológica y de seguridad. Para lograr este objetivo, en este trabajo se combinaron pruebas de caracterización fenotípica con la secuenciación y análisis del genoma, aspectos que se exponen en este capítulo.

### 4.3. Caracterización bioquímica y tecnológica de las cepas seleccionadas

Estos ensayos incluyeron pruebas de tipificación bioquímica, como la fermentación de carbohidratos y la determinación del perfil de actividades enzimáticas, junto con otras pruebas de gran interés para la utilización como fermentos, como la producción de ácidos orgánicos, formación de compuestos volátiles en leche y capacidad de inhibir microorganismos patógenos o alterantes mediante la producción de compuestos antimicrobianos.

#### 4.3.1. Utilización de carbohidratos, lípidos, proteínas y aminoácidos

El perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas analizado mediante el sistema API-50 CHL, coincidió con el esperado para sus respectivas especies (Tabla 4). El perfil de las cepas de *L. lactis* osciló entre la utilización de 13 y 21 carbohidratos. Lc 21.1 metabolizó un menor número de sustratos, siendo la única cepa de *Lactococcus* analizada que no utilizó los carbohidratos D-xilosa, D-manitol, amigdalina, D-maltosa y almidón. Este perfil es típico de cepas de lactococos bien adaptadas a la leche (“domesticadas”) (Cavanagh et al., 2015). El perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas de *S. thermophilus* difirió considerablemente en número al de *L. lactis*. Éstas, fueron capaces de utilizar solo entre 3 y 5 carbohidratos, incluyendo D-galactosa, D-glucosa, lactosa y D-sacarosa. Estos perfiles de utilización de azúcar tan limitados son característicos de esta especie (Hols et al., 2005).

**Tabla 4.** Perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* productoras de GABA.

| Especie /<br>cepa             | Carbohidratos <sup>a</sup> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                               | ARA                        | RIB | XYL | GAL | GLU | FRU | MAN | MNN | NAG | AMY | ARB | ESC | SAL | CEL | MAL | LAC | SUC | TRE | STA | GEN |
| <b><i>L. lactis</i></b>       |                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lc 5.5                        | -                          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Lc 14.4                       | +                          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Lc 19.3                       | -                          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   |
| Lc 21.1                       | -                          | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | +   | -   |
| <b><i>S. thermophilus</i></b> |                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| St 8.1                        | -                          | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| St 9.1                        | -                          | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| St 18.1                       | -                          | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| St 21.1                       | -                          | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   |

<sup>a</sup>Clave de carbohidratos utilizados: ARA L-arabinosa; RIB, D-ribosa; XYL, D-xilosa; GAL, D-galactosa; GLU, D-glucosa; FRU, D-fructosa; MAN, D-manosa; MNN, D-manitol; NAG, N-acetilglucosamina; AMY, amigdalina; ARB, arbutina; ESC, esculina; SAL, salicina; CEL, D-celobiosa; MAL, D-maltosa; LAC, lactosa; SUC, D-sacarosa; TRE, D-trehalosa; STA, almidón; GEN, gentiobiosa, GNT, gluconato. Entre paréntesis, reacción retardada (utilización débil).

Ninguna de las cepas utilizó los carbohidratos glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, D-adonitol, metil-β-D-xilopiranósido, L-sorbosa, L-ramnosa, dulcitol, inositol, D-sorbitol, metil-α-D-manopiranósido, D-melibiosa, inulina, D-melecitosa, D-rafinosa, glucógeno, xilitol, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, 2-cetogluconato y 5-cetogluconato.

Mediante el sistema API-ZYM, se analizó la capacidad enzimática de cada una de las cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* (Tabla 5). Las cepas de las dos especies mostraron una fuerte actividad de leucina aminopeptidasa y fosfohidrolasa (utilizando naftol AS-BI como sustrato). Además, las cepas de *L. lactis* evidenciaron gran actividad fosfatasa ácida y una actividad cisteína aminopeptidasa moderada. En general, las cepas de *S. thermophilus* presentaron una fuerte actividad  $\beta$ -galactosidasa, actividad valina aminopeptidasa y esterasa moderada y actividad lipásica débil. Aunque con niveles enzimáticos variables, todas las cepas de *S. thermophilus* resultaron positivas en la prueba de la ureasa. Esta actividad se evaluó mediante el ensayo con rojo de fenol midiendo el amoníaco liberado según la metodología descrita por Lányi (1987). La capacidad enzimática ureasa de las cepas de *S. thermophilus* es de gran interés aplicado, ya que algunos autores sugieren que está relacionada con la protocooperación de esta bacteria con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante la fermentación de la leche en la elaboración del yogur, la cual afecta a la tasa de acidificación (Yamauchi et al., 2019).

**Tabla 5.** Actividades enzimáticas de cepas de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* productoras de GABA mediante el sistema API-ZYM.

| Cepa                   | Actividad enzimática |     |         |     |             |             |             |     |       |      |       |       |       |       |       |       |               |       |      |
|------------------------|----------------------|-----|---------|-----|-------------|-------------|-------------|-----|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|-------|------|
|                        | Al-<br>Phos          | Est | Est-Lip | Lip | Leu-<br>Ary | Val-<br>Ary | Cys-<br>Ary | Try | α-chy | Phos | N-nph | α-gal | β-gal | β-gln | α-glu | β-glu | N-a-β-<br>glu | α-man | Urea |
| <i>L. lactis</i>       |                      |     |         |     |             |             |             |     |       |      |       |       |       |       |       |       |               |       |      |
| Lc 5.5                 | 5                    | 5   | 5       | 5   | >40         | -           | 20          | 5   | 5     | >40  | >40   | -     | -     | 5     | 5     | >40   | -             | 5     | -    |
| Lc 14.4                | 5                    | -   | 10      | 5   | >40         | -           | 5           | 5   | 5     | >40  | >40   | -     | 5     | -     | -     | >40   | -             | -     | -    |
| Lc 19.3                | 5                    | 5   | 5       | 5   | >40         | -           | 20          | 5   | 5     | >40  | >40   | -     | -     | 5     | -     | -     | -             | -     | -    |
| Lc 21.1                | 5                    | 5   | 5       | 5   | >40         | -           | 20          | 5   | 5     | 30   | 30    | -     | -     | 5     | -     | -     | -             | -     | -    |
| <i>S. thermophilus</i> |                      |     |         |     |             |             |             |     |       |      |       |       |       |       |       |       |               |       |      |
| St 8.1                 | -                    | -   | -       | 5   | >40         | 20          | -           | -   | -     | -    | >40   | -     | >40   | -     | -     | -     | -             | -     | +    |
| St 9.1                 | 5                    | 20  | 5       | 10  | >40         | 20          | 5           | 5   | 5     | 5    | >40   | 5     | >40   | 5     | -     | -     | 5             | -     | +    |
| St 18.1                | -                    | 20  | -       | 10  | >40         | 20          | -           | -   | -     | -    | >40   | -     | >40   | -     | -     | -     | -             | -     | +    |
| St 21.1                | -                    | 20  | -       | 10  | >40         | 20          | -           | -   | -     | -    | >40   | -     | >40   | -     | -     | -     | -             | -     | +    |

<sup>a</sup> Actividad: sustrato nmol hidrolizado. Clave de enzimas: Al-Phos, fosfatasa alcalina; Est: esterasa (C8); Est-Lip, esterasa-lipasa (C14); Lip, Lipasa (C 14); Leu-Ary, leucina arilamidasa; Val-Ary, valina arilamidasa; Cys-ary, arilamidasa cistina; Try, tripsina; α-chy, α-quimotripsina; Phos, fosfatasa ácida; N-nph, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa; α-gal, α-galactosidasa; β-gal, β-galactosidasa; β-gln, β-glucuronidasa; α-glu, α-glucosidasa; β-glu, β-glucosidasa; N-a-β-glu, N-acetil-β-glucosaminidasa; α-man, α-manosidasa y Urea, ureasa. Ninguna de las cepas presentó actividad α-fucosidasa.

-, sin actividad.

**Tabla 6.** Perfil de azúcares y ácidos orgánicos de las cepas productoras de GABA *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* después del crecimiento en leche semidescremada.

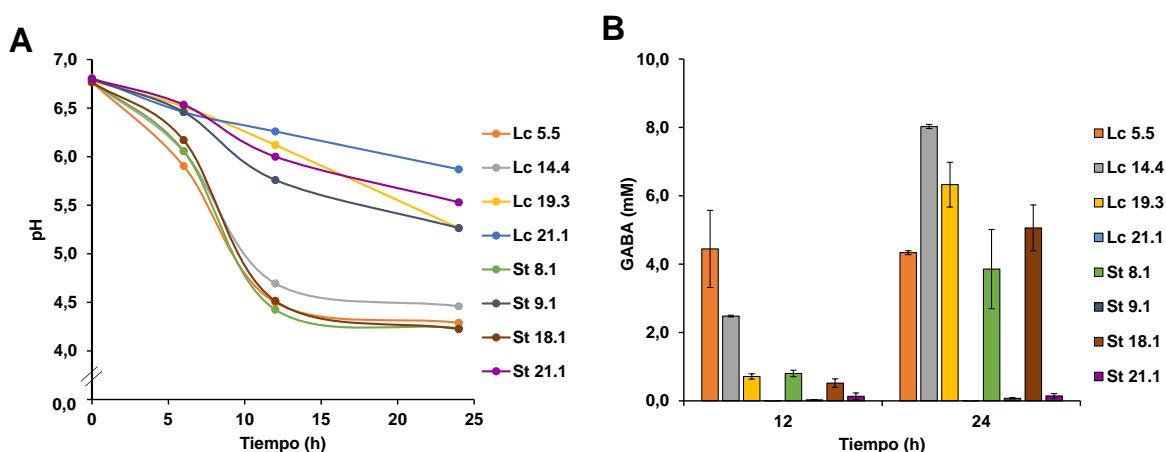
| Especie/<br>Cepa              | Azúcares y ácidos orgánicos |          |             |                  |               |                   |                    |               |                  |                  |                |                   |
|-------------------------------|-----------------------------|----------|-------------|------------------|---------------|-------------------|--------------------|---------------|------------------|------------------|----------------|-------------------|
|                               | Lactosa                     | Glucosa  | Galactosa   | Ácido<br>orótico | Ácido cítrico | Ácido<br>pirúvico | Ácido<br>succínico | Ácido láctico | Ácido<br>fórmico | Ácido<br>acético | Ácido<br>úrico | Ácido<br>hipúrico |
| <b><i>L. lactis</i></b>       |                             |          |             |                  |               |                   |                    |               |                  |                  |                |                   |
| Lc 5.5                        | 6,68±2,3                    | 2,3±0,1  | 44,4±12,2   | 9,2±2,5          | 272,5±86,4    | 7,5±1,7           | 2,1±3,0            | 938,2±224,4   | 7,3±1,4          | -                | 3,1±1,0        | -                 |
| Lc 14.4                       | 4,49±0,2                    | 1,8±0,1  | 51,4±1,5    | 6,0±0,4          | -             | 7,4±2,9           | 2,0±2,8            | 826,3±68,1    | 9,8±3,3          | 73,7±19,1        | 2,3±0,1        | 2,3±0,0           |
| Lc 19.3                       | 5,36±1,2                    | 1,9±0,1  | 59,7±22,0   | 9,4±2,5          | 218,4±47,7    | 2,8±0,8           | -                  | 405,7±132,6   | -                | 6,6±9,4          | 2,5±0,7        | 0,6±0,3           |
| Lc 21.1                       | 7,12±2,5                    | 2,5±1,3  | 18,4±5,8    | 10,7±2,9         | 21,5±8,3      | 15,1±2,9          | -                  | 281,5±62,9    | -                | 74,2±13,9        | 2,4±0,6        | 3,2±0,9           |
| <b><i>S. thermophilus</i></b> |                             |          |             |                  |               |                   |                    |               |                  |                  |                |                   |
| St 8.1                        | 5,05±1,1                    | 9,1±2,1  | 982,4±129,1 | 10,5±1,1         | 263,2±43,7    | 8,0±0,3           | -                  | 1173,3±55,5   | -                | -                | 2,9±0,4        | 2,6±0,5           |
| St 9.1                        | 5,84±1,5                    | 32,7±7,4 | 391,9±105,2 | 10,2±2,6         | 251,4±65,4    | 1,0±0,1           | -                  | 464,0±116,2   | -                | -                | 2,6±0,7        | 2,1±0,4           |
| St 18.1                       | 5,07±3,0                    | 9,0±5,4  | 972,2±547,8 | 10,8±5,8         | 265,5±147,3   | 8,3±3,4           | -                  | 1203,6±617,5  | -                | -                | 3,0±1,7        | 2,6±1,3           |
| St 21.1                       | 6,84±2,3                    | 77,0±24  | 365,5±105,8 | 11,2±3,1         | 287,7±92,2    | 1,6±0,1           | -                  | 375,6±90,4    | -                | -                | 2,6±0,6        | 2,0±0,5           |
| <b>Leche (control)</b>        | 6,53±0,3                    | 42,2±8,2 | 282,7±152,4 | 8,5±0,1          | 191,8±1,4     | 1,4±1,0           | -                  | 313,1±184,2   | -                | -                | 1,8±0,2        | 1,9±0,3           |

<sup>a</sup> Resultados expresados en mg por 100 mL de leche, excepto lactosa (g por 100 mL).

-, no detectado.

#### 4.3.2. Crecimiento en leche y producción de compuestos de interés tecnológico

Dos cepas de cada una de las especies (*L. lactis* Lc 5.5 y Lc 14.4; y, *S. thermophilus* St 8.1 y St 18.1) crecieron bien y coagularon la leche a las 12 h de incubación, con una disminución del pH de 6,70 a 4,43-4,70, lo cual facilitó la formación de un coágulo firme de buena apariencia, buen olor y agradable sabor ácido. El resto de cepas, mantuvieron el pH de la leche por encima de 6,00, y ninguna de ellas coaguló la leche incluso tras 24 h de incubación (Figura 11A). Para una rápida producción de ácido láctico, y para alcanzar una alta densidad celular en la leche, las BAL requieren sistemas eficientes para la utilización de la lactosa como fuente de carbono, pero necesitan utilizar también las caseínas como fuente de nitrógeno (Ayivi & Ibrahim, 2022).



**Figura 11.** pH (A) y producción de GABA (B) por cepas de *Lactococcus lactis* (32°C) y *Streptococcus thermophilus* (42°C) en leche semidescremada suplementada con 10 mM de glutamato monosódico.

Durante los cultivos en leche, las cepas produjeron o consumieron diferentes cantidades de ácidos orgánicos y azúcares. Sin embargo, no se observaron perfiles claros específicos de especies entre las cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* (Tabla 6). Las principales diferencias entre las cepas de *L. lactis* se asociaron con la utilización de citrato. Las cepas que utilizaron este compuesto (Lc 14.4 y Lc 21.1), y que pertenecen a la biovariedad *diacetylactis*, produjeron grandes cantidades de ácido acético. Además, las cepas Lc 5.5 y Lc 14.4 produjeron cantidades moderadas de ácidos fórmico y succínico.

**Tabla 7.** Cantidadas relativas de compuestos volátiles producidos en leche semidescremada por las cepas de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*.

| Compuesto <sup>a</sup>     | Control | <i>L. lactis</i> |         |         |         | <i>S. thermophilus</i> |        |         |         |
|----------------------------|---------|------------------|---------|---------|---------|------------------------|--------|---------|---------|
|                            | leche   | Lc 5.5           | Lc 14.4 | Lc 19.3 | Lc 21.1 | St 8.1                 | St 9.1 | St 18.1 | St 21.1 |
| <b>Alcoholes</b>           |         |                  |         |         |         |                        |        |         |         |
| 2-feniletanol              | -       | 19,13            | 33,26   | -       | -       | -                      | -      | -       | -       |
| Alcohol isoamílico         | -       | 100,86           | 164,49  | -       | -       | -                      | -      | -       | -       |
| <b>Ácidos carboxílicos</b> |         |                  |         |         |         |                        |        |         |         |
| Ácido acético              | -       | 3,63             | 14,36   | 3,28    | 6,2     | 1,39                   | 0,84   | 1,63    | 0,64    |
| Ácido benzoico             | -       | 13,44            | 0,86    | 12,26   | 0,57    | 2,55                   | 5,19   | 0,95    | 4,24    |
| Ácido butanoico            | 0,26    | 4,43             | 3,85    | 4,67    | 2,39    | 6,09                   | 5,09   | 6,38    | 4,89    |
| Ácido hexanoico            | 1,07    | 33,09            | 31,86   | 33,35   | 20,27   | 38,75                  | 35,79  | 39,55   | 34,24   |
| Ácido heptanoico           | -       | 0,98             | 1,01    | 1,04    | -       | 0,85                   | 0,81   | 0,94    | 0,81    |
| Ácido octanoico            | 1,87    | 35,99            | 37,83   | 36,51   | 30,9    | 41,25                  | 40,64  | 42,48   | 39,72   |
| Ácido n-decanoico          | 2,62    | 20,69            | 21,14   | 19,67   | 18,07   | 21,6                   | 20,34  | 22,58   | 20,23   |
| Ácido 9-decanoico          | -       | 2,27             | 2,37    | 2,32    | 1,82    | 2,8                    | 2,54   | 2,8     | 2,47    |
| Ácido nonanoico            | -       | 0,48             | 0,71    | 0,7     | 0,56    | 0,63                   | 0,76   | 0,84    | 0,73    |
| Ácido dodecanoico          | 0,52    | 3,62             | 3,48    | 3,11    | 2,73    | 4,38                   | 3,64   | 4,09    | 4,05    |
| Ácido tetradecanoico       | -       | -                | -       | -       | -       | 1,04                   | 0,82   | 0,95    | 0,88    |
| Ácido isovalérico          | -       | 14,99            | 31,97   | 7,96    | -       | -                      | -      | -       | -       |
| <b>Cetonas</b>             |         |                  |         |         |         |                        |        |         |         |
| Acetoina <sup>b</sup>      | -       | -                | 17,02   | -       | 25,54   | 13,58                  | 8,31   | 12,81   | 9,82    |
| 2-Heptanona                | 2,67    | -                | -       | -       | -       | 3,86                   | 3,26   | 4,42    | 3,38    |
| 2-Nonanona                 | 1,85    | 2,12             | 1,9     | 2,05    | 3,06    | 2,56                   | 2,6    | 2,96    | 2,52    |
| 2-Pentadecanona            | -       | -                | 0,55    | -       | -       | -                      | -      | -       | -       |
| 2-Tridecanona              | 0,37    | 0,52             | 0,58    | 0,51    | 0,47    | 0,56                   | 0,65   | 0,66    | 0,65    |
| 2-Undecanona               | 0,86    | 1,09             | 1,17    | 1,28    | 1,2     | 1,45                   | 1,41   | 1,54    | 1,44    |
| 4-Octanona                 | -       | 40,7             | 79,5    | 20,59   | -       | -                      | -      | -       | -       |
| 2,5-Dimetil-3-hexanona     | -       | -                | 3,99    | 0,67    | -       | -                      | -      | -       | -       |
| <b>Lactonas</b>            |         |                  |         |         |         |                        |        |         |         |
| δ-Decalactona              | 0,35    | 0,66             | 0,7     | 0,66    | 0,62    | 0,73                   | 0,64   | 0,71    | 0,61    |
| γ-Dodecalactona            | 0,35    | 0,45             | 0,43    | 0,4     | 0,4     | 0,47                   | 0,66   | 0,48    | 0,5     |
| δ-Dodecalactona            | 0,44    | 0,69             | 0,71    | 0,63    | 0,61    | 0,83                   | 0,74   | 0,78    | 0,76    |
| <b>Otros</b>               |         |                  |         |         |         |                        |        |         |         |
| Benzaldeido                | 0,60    | 1,49             | 1,63    | 1,35    | 0,72    | 0,77                   | -      | 0,81    | -       |
| Fenil acetaldeido          | 0,34    | 11,12            | 11,73   | 4,56    | -       | -                      | -      | -       | -       |
| 2,3-Heptanodiona           | -       | -                | 1,72    | 0,89    | -       | -                      | -      | -       | -       |
| 5-Metil-2-fenil-2-hexenal  | -       | 1,45             | 1,62    | -       | -       | -                      | -      | -       | -       |

<sup>a</sup>Valores del área relativa de los cromatogramas en comparación con la del patrón interno de estireno.<sup>b</sup> El diacetilo no se puede detectar con el método de cromatografía de gases por micro-extracción en fase sólida (SPME) utilizado en este trabajo.

-, no detectado.

Los perfiles de fermentación de azúcares y producción de compuestos orgánicos de las cepas de *S. thermophilus* parecieron estar influenciados principalmente por la capacidad para crecer en

leche. Las cepas St 8.1 y St 18.1 presentaron buen crecimiento y generaron grandes cantidades de ácido láctico, liberando también cantidades notables de galactosa. Por el contrario, la actividad metabólica de las cepas St 9.1 y St 21.1, que no crecieron bien en leche, fue escasa. Al mismo tiempo, estas dos cepas liberaron cantidades notables de glucosa, lo que sugiere una lisis celular prematura. Ninguna de las cepas de *S. thermophilus* utilizó el citrato de la leche, pero todas produjeron cantidades moderadas de acetoína. Se cree que *S. thermophilus* produce diacetilo y acetoína desviando el  $\alpha$ -acetolactato que puede formarse por un exceso de aminoácidos de cadena ramificada (Monnet et al., 2003).

Tras el cultivo en leche de las cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* a 32°C y 42°C, respectivamente, se detectaron por cromatografía de gases un total de 29 compuestos volátiles (Tabla 7), 15 de los cuales no estuvieron presentes en la leche de partida. En las cepas de *L. lactis* no se observó un perfil de volátiles específico de especie, debido al comportamiento divergente de la cepa Lc 21.1. A diferencia de las otras, esta cepa no produjo ácido isovalérico, 4-octanona ni fenilacetaldehído. Además, Lc 5.5 y Lc 14.4 produjeron 2-feniletanol, alcohol isoamílico y 5-metil-2-fenil-2-hexenal. Lc 14.4 produjo acetoína y grandes cantidades de ácido acético. Por su parte, Lc 5.5 y Lc 19.3 produjeron cantidades notables de ácido benzoico, mientras que Lc 14.4 y Lc 19.3 produjeron 2,5-dimetil-3-hexanona y 2,3-heptanodiona. Por el contrario, aunque con pequeñas diferencias entre cepas, las cepas de *S. thermophilus* ensayadas mostraron perfiles de compuestos volátiles especie-específicos. En concreto, el ácido tetradecanoico y la 2-heptanona fueron los compuestos volátiles asociados exclusivamente con *S. thermophilus*.

#### **4.3.3. Capacidad para sintetizar péptidos antimicrobianos**

La producción de péptidos antimicrobianos, como las bacteriocinas o sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas (BLIS), capaces de inhibir microorganismos alterantes y patógenos, es una propiedad que puede emplearse para incrementar la calidad e inocuidad de los alimentos (Mokoena et al., 2021).

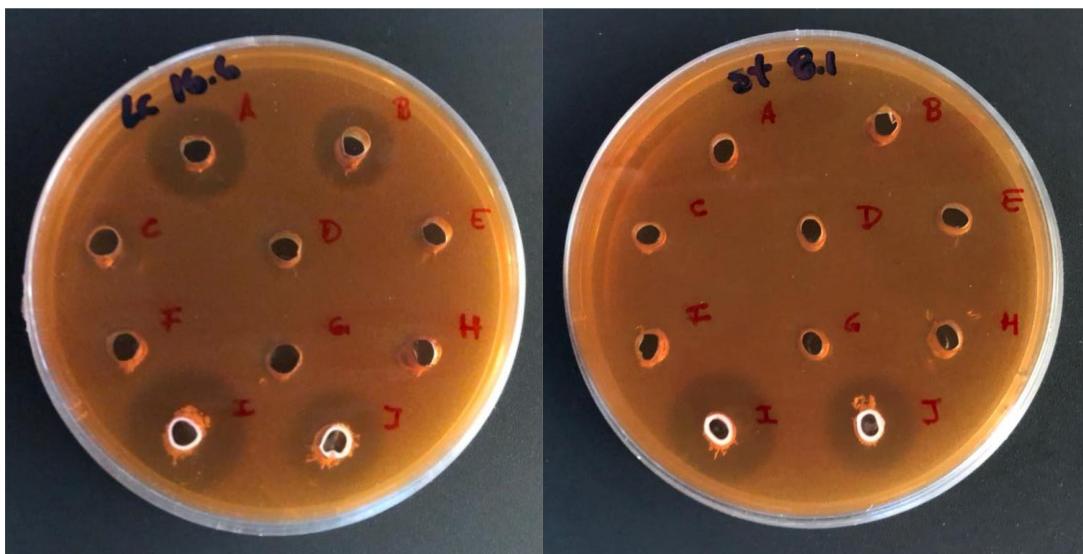


Figura 12. Ensayo de difusión en agar para determinar la producción de bacteriocinas en *Lactococcus lactis* Lc 16.6 y *Streptococcus thermophilus* St 8.1. A-sobrenadante; B-sobrenadante neutralizado con NaOH 0,1N; C, D, F, G y H diluciones 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32 y 1/64 respectivamente; I y J sobrenadante y sobrenadante neutralizado con NaOH 0,1N de control positivo (+): cultivo de *Lactiplantibacillus plantarum* LL441 respectivamente. Se utilizó como cepa indicadora *Latilactobacillus sakei* CECT 906<sup>T</sup> sembrada en el césped.

Se analizó la capacidad de producción de bacteriocinas/BLIS en las 14 cepas (6 *L. lactis* y 8 *S. thermophilus*) pre-seleccionadas como productoras de GABA, que posteriormente se tipificaron en el apartado 4.2 (Figura 10). Solamente, la cepa Lc 16.6 de *L. lactis* presentó halo de inhibición, lo que sugiere la producción de una posible bacteriocina (Figura 12). Mientras que ninguna de las 8 cepas seleccionadas por su mayor producción de GABA y diversidad génica produjo inhibición de la cepa indicadora (*Latilactobacillus sakei* CECT 906<sup>T</sup>).

#### 4.3.4. Producción de GABA en leche suplementada con GMS

Las cepas seleccionadas productoras de GABA, se incubaron en leche semidescremada de vaca (materia prima de productos lácteos fermentados) suplementada con GMS (10 mM) y se determinó su capacidad para producir GABA en estas condiciones.

Cuando la leche se complementó con glutamato monosódico 10 mM, el comportamiento de las cepas fue prácticamente idéntico al observado en la leche sin suplementar; solo se observaron diferencias mínimas en los perfiles de acidificación. La producción de GABA en la leche suplementada con GMS se asoció principalmente con la capacidad de las distintas cepas para crecer en este medio (Figura 11B): aquellas cepas que no crecieron, fueron incapaces de sintetizar GABA. En las cepas de *S. thermophilus*, la síntesis de GABA mostró un retraso en comparación con lo observado en las cepas de *L. lactis*. A las 12 h de incubación, sólo *L. lactis* Lc 5.5 y Lc 14.4 produjeron cantidades significativas ( $p<0,05$ ;  $p=0,000043$ ) de GABA, mientras que a las 24 h lo hicieron una cepa más de *L. lactis* (Lc 19.3) y dos de *S. thermophilus* (St 8.1 y St 18.1). En medios de laboratorio, la presencia de GMS en los cultivos causó un ligero aumento en el pH final respecto al de los cultivos sin glutamato ( $0,23 \pm 0,06$ ).

Sin embargo, este efecto no se observó en la leche, quizá como resultado de su mayor poder tampón (Aydogdu et al., 2023). En general, la cantidad de GABA producida por las cepas fue similar a la descrita en otras cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* (Linares et al., 2016; Renes et al., 2017; Redruello et al., 2021).

#### **4.3.5. Producción de GABA en homogeneizados fecales**

La posible producción de GABA por las cepas empleadas en este trabajo se evaluó también en homogeneizados de cultivos fecales humanos suplementados con 30 mg/mL de GMS. Esta evaluación se llevó a cabo ante la posibilidad de poder utilizar las cepas como probióticas (Bintsis, 2018), persiguiendo una producción de GABA en el intestino tras la ingesta. Esta característica se identificó en algunas cepas de lactobacilos y *Bifidobacterium* spp. de origen intestinal (Barret et al., 2012; Duranti et al., 2020). El ensayo se realizó siguiendo el procedimiento de Barrett et al. (2012), en estas condiciones, ninguna de las cepas produjo GABA en homogeneizados fecales suplementados con GMS. Dada la concentración microbiana presente en los homogeneizados fecales, no fue posible evaluar el crecimiento específico de las cepas ensayadas, pero se considera que la gran carga microbiana de especies adaptadas al ambiente intestinal impidió el crecimiento de las cepas en evaluación en los homogeneizados.

### **4.4. Evaluación de la seguridad biológica de las cepas seleccionadas**

Entre las características de seguridad alimentaria que se consideraron, se determinó la capacidad potencial para generar metabolitos indeseables para la salud humana, tales como la producción de aminas biógenas, y la presencia de resistencia a antibióticos transmisibles. Estas resistencias podrían transmitirse, en último término, a las bacterias patógenas y generar un riesgo para el tratamiento de las enfermedades infecciosas (EFSA FEEDAP Panel, 2018).

#### **4.4.1 Producción de aminas biógenas**

La producción de las aminas biógenas (AB) histamina, tiramina y putrescina se ensayó en medios de cultivo líquidos en presencia de sus correspondientes aminoácidos precursores: histidina, tirosina y ornitina y agmatina, respectivamente. Los ensayos se llevaron a cabo con una concentración de los precursores de 5mM y tras 48 h de incubación en las condiciones óptimas de cultivo para cada especie. Tras la incubación, los sobrenadantes se centrifugaron, filtraron, derivatizaron y, finalmente, se analizaron mediante UHPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Producción de aminas biógenas (mM) por aislados de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*.

| <i>Cepas</i> | <i>Histamina</i><br>(mM - mg/kg) | <i>Tiramina</i><br>(mM - mg/kg) | <i>Putrescina</i><br>(mM - mg/kg) |
|--------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Lc 5.5       | nd                               | 0,060(8,23)                     | 0,041(3,61)                       |
| Lc 14.4      | nd                               | 0,064(8,78)                     | 0,530(46,71)                      |
| Lc 19.3      | nd                               | 0,061(8,36)                     | 0,315(27,76)                      |
| Lc 21.1      | nd                               | 0,054(7,4)                      | 0,118(10,40)                      |
| St 8.1       | 0,005(0,55)                      | 0,093(12,76)                    | nd                                |
| St 9.1       | 0,052(5,77)                      | 0,088(12,07)                    | nd                                |
| St 18.1      | 0,034(3,78)                      | 0,088(12,07)                    | nd                                |
| St 21.1      | 0,042(4,67)                      | 0,077(10,56)                    | nd                                |

nd: no detectable

Los resultados mostraron que las cepas analizadas produjeron cantidades muy pequeñas de las AB: histamina, tiramina y putrescina (Tabla 8). En Europa, la única regulación que legisla las cantidades de AB en alimentos hace referencia tan solo a la histamina en pescado y sus derivados. Sin embargo, basándose en resultados de numerosas investigaciones, la EFSA recomienda valores máximos de referencia para otras muchas AB en alimentos fermentados (EFSA BIOHAZ Panel, 2011). De forma más reciente, DeBeer et al. (2021) determinaron que una ingesta de 50 mg/kg de histamina no causa síntomas en personas sanas (valor NOAEL; *No Observed Adverse Effect Limit*), y sugirieron un valor NOAEL máximo para tiramina de 600 mg/kg de alimento. Para otras aminas, en cambio, como la putrescina, existen escasos informes sobre sus efectos en la salud y menos aún de la relación dosis-efecto. En estos casos la EFSA sugiere un límite máximo de 180 mg/kg.

#### 4.4.2. Perfiles de sensibilidad-resistencia a antibióticos

Para evaluar la presencia de resistencia a antibióticos transmisibles, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas productoras de GABA frente a 16 antibióticos. El análisis se realizó utilizando las microplacas comerciales Sensititre EULACBI 1 y 2, diseñadas específicamente para microorganismos anaerobios (Thermo Scientific). En la Tabla 9, se presentan los valores de CIM obtenidos para las 8 cepas ensayadas frente a los distintos antibióticos. A modo de referencia para discriminar entre bacterias sensibles y resistentes, se incluyen también los valores de puntos de corte microbiológico (*cut-off*) emitidos por EFSA (2018) para las especies *L. lactis* y *S. thermophilus*.

**Tabla 9.** Concentración inhibitoria mínima (CIM) de 16 antibióticos para *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* productores de GABA.

| Especie/cepa                       | Concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{g/mL}$ ) |           |           |    |          |          |          |          |          |      |          |      |    |     |    |      |
|------------------------------------|---|-----------|-----------|----|----------|----------|----------|----------|----------|------|----------|------|----|-----|----|------|
|                                    | Gm  | Km        | Sm        | Nm | Tc       | Em       | Cl       | Cm       | Am       | Pc   | Va       | Q-da | Lz | Tm  | Ci | Rif  |
| <b><i>L. lactis</i></b>            |   |           |           |    |          |          |          |          |          |      |          |      |    |     |    |      |
| <b>Lc 5.5</b>                      | 1   | 8         | 32        | 4  | 0,5      | 0,12     | 0,06     | 8        | 0,5      | 0,5  | 0,25     | 2    | 4  | >64 | 4  | 16   |
| <b>Lc 14.4</b>                     | 2   | 8         | 16        | 8  | 0,5      | 0,12     | 0,5      | 8        | 0,5      | 0,5  | 0,5      | 4    | 4  | >64 | 4  | 16   |
| <b>Lc 19.3</b>                     | 1   | 8         | 16        | 16 | 0,12     | 0,06     | 0,12     | 4        | 0,5      | 0,5  | 0,25     | 4    | 2  | >64 | 2  | 16   |
| <b>Lc 21.1</b>                     | <0,5  | 8         | 16        | 1  | 1        | 0,12     | 0,06     | 4        | 0,25     | 0,25 | 0,5      | 2    | 2  | >64 | 2  | >64  |
| <b>EFSA's cut-offs<sup>a</sup></b> | <b>32</b>   | <b>64</b> | <b>32</b> | -  | <b>4</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>8</b> | <b>2</b> | -    | <b>4</b> | -    | -  | -   | -  | -    |
| <b><i>S. thermophilus</i></b>      |   |           |           |    |          |          |          |          |          |      |          |      |    |     |    |      |
| <b>St 8.1</b>                      | 2   | 16        | 8         | 2  | 0,5      | 0,12     | 0,03     | 2        | 0,12     | 0,12 | 1        | 0,25 | 2  | 64  | 2  | 0,12 |
| <b>St 9.1</b>                      | 8   | 128       | 32        | 32 | 1        | 0,06     | 0,03     | 4        | 0,25     | 0,5  | 0,5      | 0,25 | 2  | 64  | 2  | 0,25 |
| <b>St 18.1</b>                     | 1   | 16        | 8         | 4  | 1        | 0,25     | 0,03     | 4        | 0,12     | 0,12 | 1        | 0,25 | 2  | 64  | 2  | 0,12 |
| <b>St 21.1</b>                     | 2   | 16        | 8         | 4  | 0,5      | 0,12     | 0,03     | 4        | 0,12     | 0,5  | 0,25     | 0,12 | 2  | >64 | 4  | 0,12 |
| <b>EFSA's cut-offs<sup>a</sup></b> | <b>32</b>   | -         | <b>64</b> | -  | <b>4</b> | <b>2</b> | <b>2</b> | <b>4</b> | <b>2</b> | -    | <b>4</b> | -    | -  | -   | -  | -    |

Clave de antibióticos: GM, gentamicina; Km, kanamicina; Sm: estreptomicina; Nm: neomicina; Tc: tetraciclina; Em, eritromicina; Cl, clindamicina; Cm, cloranfenicol; Am, ampicilina; Pc: penicilina G; Va, vancomicina; Q-da, quinupristina-dalfopristina; Lz, linezolid; Tm, trimetoprim; Ci: ciprofloxacino; Rif, rifampicina.

<sup>a</sup> Los puntos de corte aplicados fueron los de la EFSA (Comisión Técnica FEEDAP de la EFSA, 2018).

Según estos valores de referencia, las cepas ensayadas fueron susceptibles a todos los antibióticos para los que la EFSA estableció un punto de corte entre microorganismos resistentes y sensibles (Tabla 9). Sin embargo, todas las cepas fueron resistentes a la trimetoprima, resistencia intrínseca característica de los cocos lácticos. Esto se debería a que la mayor parte de las BAL poseen capacidades biosintéticas limitadas y carecen de la vía de síntesis del ácido fólico, lo que las hace, en su mayoría, resistentes a este antibiótico (Ammor et al., 2007). Desviándose del perfil, *L. lactis* Lc 21.1 y *S. thermophilus* St 9.1 mostraron valores elevados de CIM para rifampicina ( $> 64 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ) y kanamicina ( $128 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente. El análisis genómico posterior podrá proporcionar información sobre la presencia de los respectivos genes de resistencia y el posible riesgo de la utilización de estas cepas en la elaboración de productos lácteos.

#### 4.5. Caracterización molecular de las cepas seleccionadas

En la actualidad, la secuenciación genómica es la técnica más poderosa para estimar la potencialidad funcional de los microorganismos (Loman & Pallen, 2015). En este estudio, la secuenciación genómica tuvo como objetivo comprender la base genética de la producción de GABA y asegurar la inocuidad alimentaria del empleo de las 8 cepas. El análisis *in silico* de los datos genómicos mediante herramientas informáticas que posibilitan la hibridación digital ADN-ADN (dDDH; *digital DNA-DNA Hybridization*) o los valores de la media de identidad nucleotídica (ANI; *Average Nucleotide Identity*) confirmó la identificación taxonómica de todas las cepas. Para llevar a cabo este análisis, la secuencia genómica de las cepas se comparó con la de cepas tipo de especies relacionadas, incluidas las de las especies y subespecies *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *L. cremoris* subsp. *cremoris* y *L. cremoris* subsp. *tructae*, *S. thermophilus* y otras relacionadas pertenecientes al género *Streptococcus* (ANEXO IV, Tabla 1).

Estos análisis confirmaron la identificación previa de las cepas como *L. lactis* subsp. *lactis* o *S. thermophilus*. Además, *L. lactis* Lc 21.1 se identificó como perteneciente a la biovariedad *diacetylactis*, tal como lo relacionaron los resultados de la utilización del citrato mencionados anteriormente. Los valores de dDDH y ANI (orthoANI) de Lc 14.4 respecto a la cepa tipo de *diacetylactis* mostraron ser ligeramente menores a los valores de Lc 21.1. Sin embargo, ambos parámetros situaron a Lc 14.4 más cerca de la cepa tipo *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (GL2<sup>T</sup>) que de *L. lactis* subsp. *lactis* (ATCC 19435<sup>T</sup>). Estos resultados también están en consonancia con los observados en las pruebas bioquímicas.

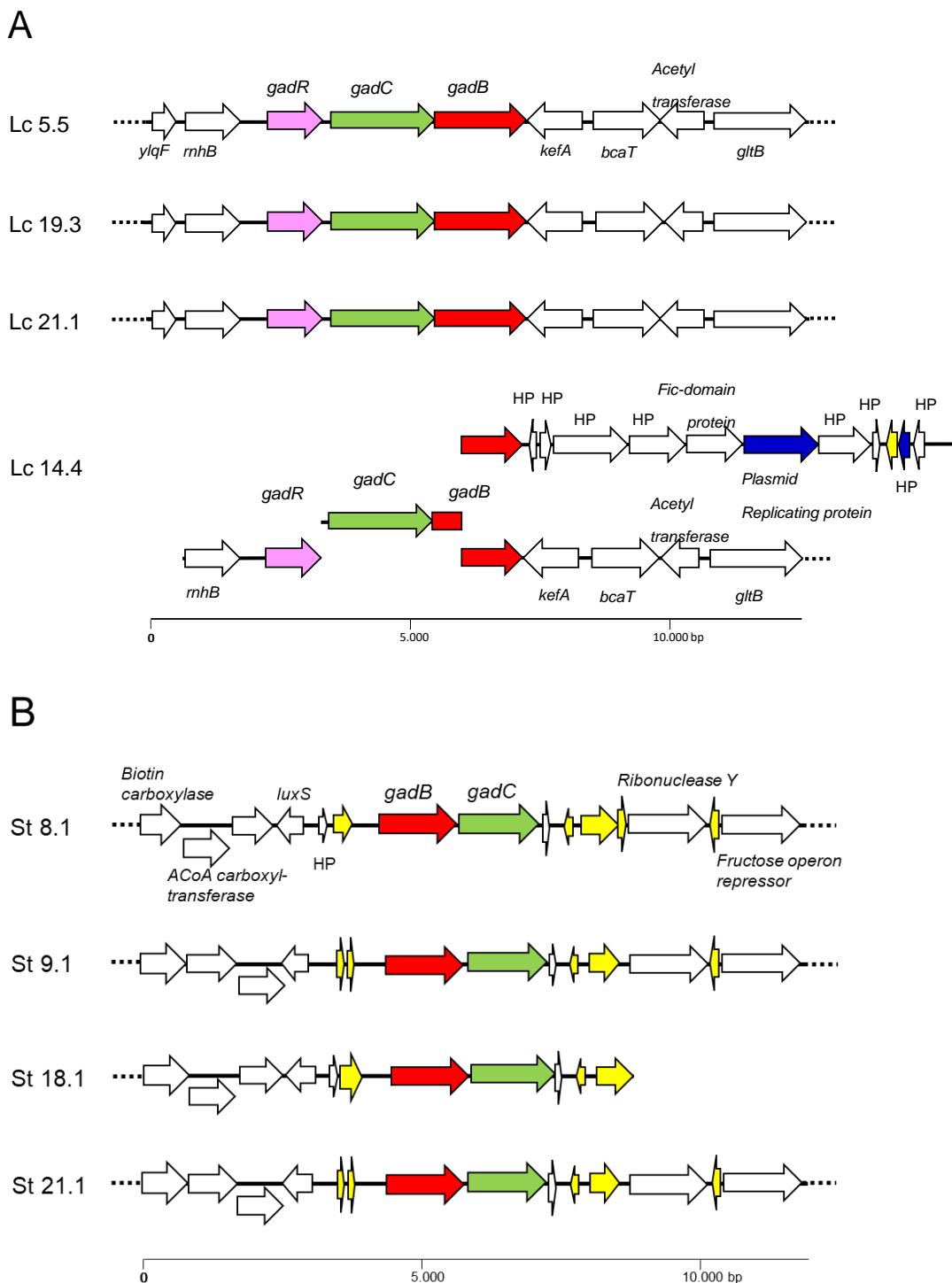
**Tabla 10.** Características generales de la secuencia del genoma completo de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* productores de GABA.

| Genes codificadores de proteínas/propiedades | Especies y cepas |           |           |           |                        |                 |           |           |
|--|------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------------|-----------|-----------|
|  | <i>L. lactis</i> |           |           |           | <i>S. thermophilus</i> |                 |           |           |
|  | Lc 5.5           | Lc 14.4   | Lc 19.3   | Lc 21.1   | St 8.1                 | St 9.1          | St 18.1   | St 21.1   |
| Tamaño del genoma (pb)                       | 2.718,046        | 2.652,084 | 2.575,310 | 2.433,628 | 1.806,293              | 1.761,434       | 1.807,628 | 1.794,253 |
| Contenido de G+C                             | 34,77            | 34,89     | 34,95     | 34,99     | 38,91                  | 38,92           | 38,96     | 39,00     |
| Nº de contigs                                | 95               | 73        | 84        | 104       | 46                     | 49              | 54        | 45        |
| Nº de código de secuencias                   | 2.882            | 2.762     | 2.721     | 2.558     | 2.043                  | 1.989           | 2.043     | 2.041     |
| Nº de subsistemas BV-BRC                     | 207              | 207       | 208       | 204       | 202                    | 202             | 202       | 202       |
| Proteínas fijadoras de penicilina            | 2                | 2         | 2         | 2         | 2                      | 2               | 2         | 2         |
| Proteínas relacionadas con el eflujo         | 28               | 24        | 29        | 27        | 27                     | 34              | 28        | 34        |
| Factores de Virulencia (VFDB/Victors)        | 2/8              | 2/9       | 1/8       | 1/7       | 1/39                   | 1/41            | 1/39      | 1/41      |
| Resistencia a Antibióticos (BV-BRC/CARD)     | 26/2             | 26/2      | 27/2      | 26/2      | 24/0                   | 24/0            | 24/0      | 24/0      |
| Resistencia a los metales pesados            | 1                | 2         | 2         | 1         | 2                      | 2               | 2         | 2         |
| Secuencias de ARNr (23S+16S+5S)              | 4 (1+1+2)        | 4 (1+1+2) | 4 (1+1+2) | 4 (1+1+2) | 3 (1+1+1)              | 2 (1+1+0)       | 3 (1+1+1) | 2 (1+1+0) |
| Moléculas de ARNt                            | 52               | 50        | 50        | 51        | 37                     | 30              | 35        | 30        |
| Proteasas                                    | 12               | 15        | 12        | 15        | 11                     | 11              | 11        | 11        |
| Peptidasas                                   | 26               | 27        | 27        | 26        | 25                     | 23              | 26        | 23        |
| Transposasas/integrasas/excisionasas         | 27               | 18        | 24        | 24        | 25                     | 24              | 24        | 26        |
| Proteínas derivadas de fagos                 | 333              | 245       | 252       | 225       | 7                      | 5               | 6         | 61        |
| Proteínas de replicación de plásmidos        | 13               | 11        | 14        | 12        | 1                      | 1 (tipo pUB110) | 1         | -         |
| CRISPR-Loci Cas                              | 0                | 0         | 0         | 0         | 3                      | 3               | 3         | 3         |

|               |                                     |  |                               |                                 |  |                                    |                                    |                                    |
|---------------|-------------------------------------|--|-------------------------------|---------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Bacteriocinas | Lactocicina B y Q,<br>sactipéptidos | Enterolisina A,<br>lactocicina A,<br>B y Q,<br>sactipéptidos | 2 x lactocicina B, linalidina | Lactocicina B,<br>sactipeptidos | BhtR, BlpD,<br>BlpK, BlpU,<br>estreptido | BlpD, BlpK,<br>BlpU,<br>estreptido | BlpD, BlpK,<br>BlpU,<br>estreptido | BlpD, BlpK,<br>BlpU,<br>estreptido |
|---------------|-------------------------------------|--|-------------------------------|---------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|

BV-BRC, CARD, VFDB y Victors se refieren al programa de anotación, así como a las bases de datos de resistencia a antibióticos y factores de virulencia y patogenicidad.

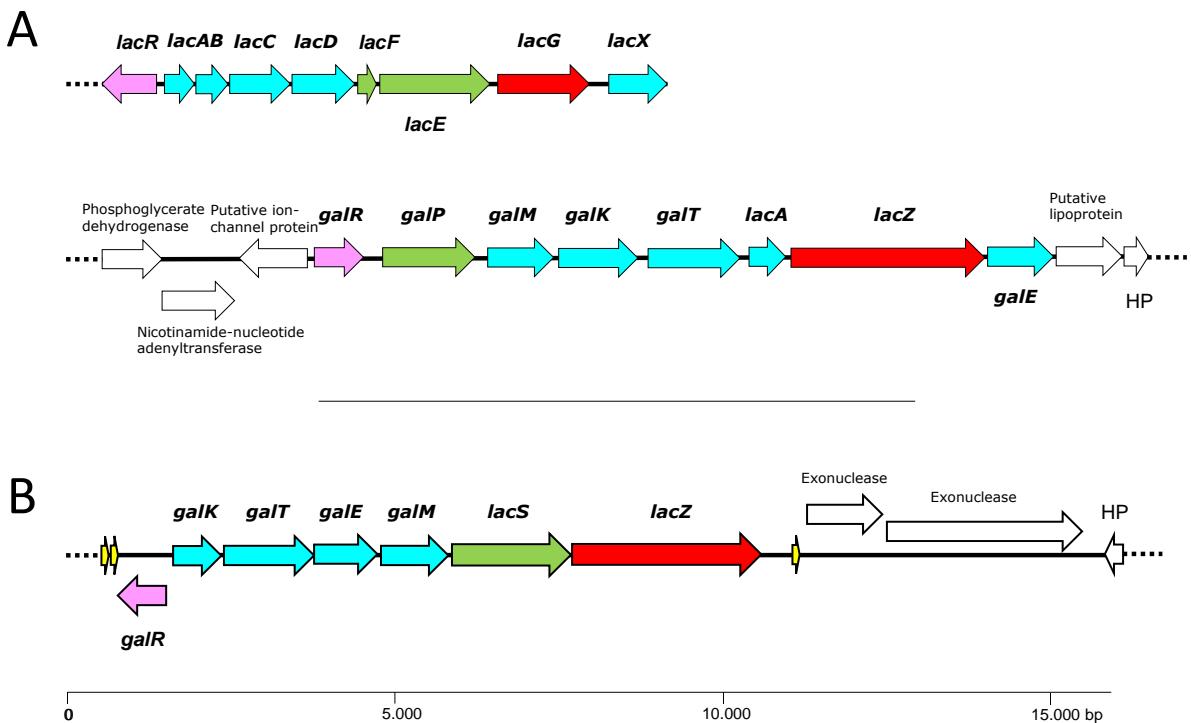
-, no detectado.



**Figura 13.** Organización genética de los operones GABA encontrados en el genoma de las cepas de *Lactococcus lactis* (A) y *Streptococcus thermophilus* (B). Código de color: en rojo, genes que codifican a la enzima glutamato descarboxilasa (*gadB*); en verde, genes que codifican los antiportadores GABA/H<sup>+</sup> (*gadC*), en morado, genes que codifican para la proteína reguladora (*gadR*); en amarillo, genes que codifican para transposasas; en blanco, genes que codifican proteínas de otros sistemas o ORFs que codifican proteínas hipotéticas. Se encontró que el operón GABA de *Lactococcus lactis* Lc 14.1, se extendía en cuatro cōntigos diferentes. Las líneas punteadas indican que los cōntigos se extienden más allá del área representada.

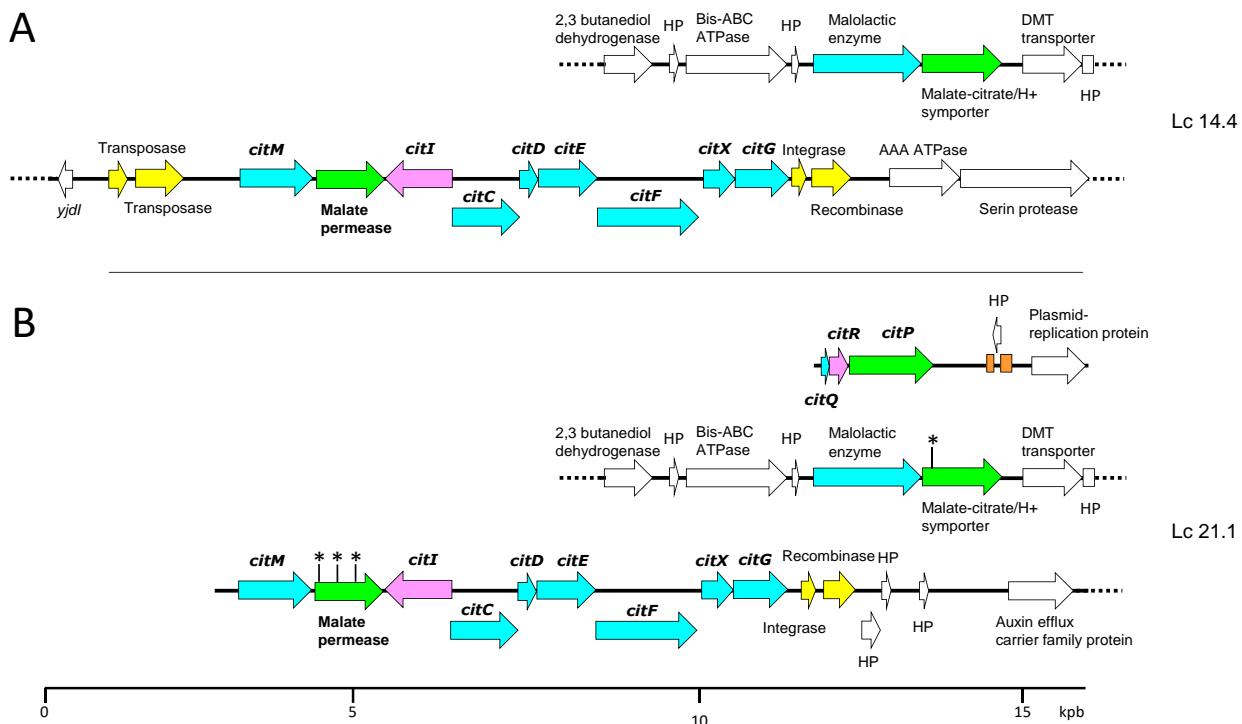
La Tabla 10 muestra las características generales de los genomas de todas las cepas secuenciadas. El análisis genómico mostró que todas las cepas portan los genes que codifican la enzima glutamato descarboxilasa (*gadB*) y su correspondiente antiportador asociado (*gadC*), organizados en una estructura de tipo operón (Figura 13). El ensamblaje del genoma de *L. lactis* Lc 14.4 dividió el operón GABA en cuatro cíntigos, impidiendo determinar su estructura de forma precisa. Uno de los cíntigos albergaba genes que codifican proteínas implicadas en la replicación de plásmidos, lo cual sugiere que podrían existir dos copias del operón GABA en el genoma de esta cepa, una de las cuales podría estar codificada en un plásmido. Esta duplicidad génica podría explicar el fallo en el ensamblaje del operón GABA en Lc 14.4 (Figura 13A). Como está descrito en otras cepas de estas especies (Cui et al. 2020; Laroute et al., 2023), el orden de los genes *gad* en *L. lactis* y *S. thermophilus* está invertido, y los marcos de lectura abierta (ORF; *Open Reading Frame*) flanqueantes son diferentes en las dos especies (Figura 13B). El operón GABA en *L. lactis* está flanqueado por genes cromosómicos que codifican a la ribonucleasa HII (*rnhB*) y un sistema de eflujo de potasio (*kefA*). Por delante de los genes *gad*, el operón en *L. lactis* comprende también el gen regulador del sistema (*gadR*) (Figura 13A). Por su parte, el operón GAD de *S. thermophilus* también está codificado en el cromosoma y en la misma posición en todas las cepas. Sin embargo, en esta especie, el operón carece del gen que codifica al regulador y está flanqueado por secuencias que codifican elementos de inserción (IS; *Insertion Sequences*) y proteínas de movilización (Figura 13B), lo cual sugiere que la capacidad para producir GABA en *S. thermophilus* es una propiedad de reciente adquisición por transferencia horizontal.

La dotación genética para la utilización de la lactosa y galactosa como fuentes de carbono incluye agrupaciones de genes para su degradación a través de la vía de Leloir en las cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus*, y un operón para su uso a través de la vía de la tagatosa-6-fosfato en los genomas de todas las cepas de lactococos (Figura 14). Estas rutas metabólicas están bien caracterizadas en cepas de muchas especies de BAL, incluidas *L. lactis* y *S. thermophilus* (Iskandar et al., 2019).



**Figura 14.** Organización genética de los operones lactosa/galactosa encontrados en los genomas de las cepas de *Lactococcus lactis* (A) y *Streptococcus thermophilus* (B). Código de color: en rojo, genes que codifican a la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*) o la fosfo- $\beta$ -galactosidasa (*lacG*); en verde, genes implicados en el transporte (*lacFE*, componentes de PEP-PTS; *galP*, permeasa de galactosa; *lacS*, permeasa de lactosa/galactosa); en morado, genes que codifican proteínas reguladoras (*lacR*, *galR*); en celeste, otros genes del metabolismo del azúcar (*lacAB*, galactosa isomerasa; *lacC*, tagatosa-6-fosfato quinasa; *lacD*, tagatosa-1,6-fosfato aldolasa; *galE*, UDP-glucosa-4-epimerasa; *galK*, galactoquinasa; *galM*, aldosa-1-epimerasa; *galT*, Galactosa-1-fosfato uridiltransferasa; *lacA*, galactósido acetiltransferasa); en amarillo, genes parciales que codifican transposasas; en blanco, genes que codifican proteínas de otros sistemas o ORFs que codifican proteínas hipotéticas. Las líneas punteadas indican que el cónigo se extiende más allá del área representada.

El análisis del genoma de las dos cepas de *L. lactis* que utilizan citrato (Lc 14.4 y Lc 21.1) reveló diferencias sorprendentes en la composición de genes asociados con su metabolismo (Figura 15). En Lc 21.1 se identificaron tres operones, cada uno ubicado en un cónigo diferente. Se consideró que dos de los operones están ubicados en el cromosoma bacteriano, ya que se encuentran asociados a genes del metabolismo basal, y codifican el complejo de la citrato liasa y una enzima maloláctica, respectivamente. Cada uno de los operones alberga un gen que codifica una permeasa similar al transportador citrato/H<sup>+</sup>; este gen, sin embargo, mostró mutaciones que podrían dar como resultado una enzima inactiva. El tercer operón se encontró en un cónigo junto con genes que codifican proteínas de replicación plasmídica, lo cual sugiere una ubicación en un plásmido.



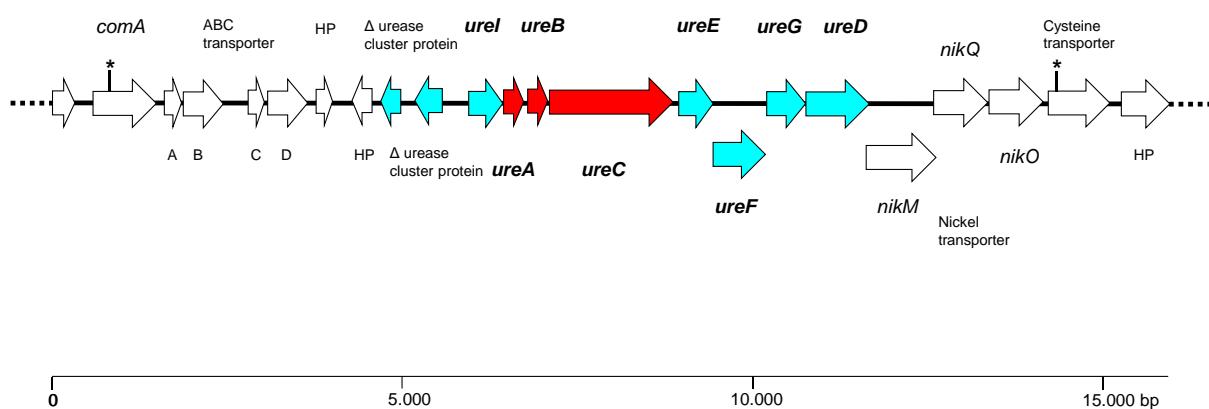
**Figura 15.** Organización genética de los grupos de genes de citrato encontrados en el genoma de *Lactococcus lactis*, Lc 14.4 (A) y Lc 21.1 (B). Código de color: en celeste, genes del operón citrato liasa (*citM-citCDEXG*) y de la enzima maloláctica (*mleA*); en verde, genes implicados en el transporte, incluyendo la permeasa de citrato (*citP*) y dos simportadores de malato-citrato/H<sup>+</sup>; en púrpura, genes que codifican proteínas reguladoras; en amarillo, genes que codifican proteínas de movilización; en blanco, otros genes o genes que codifican proteínas hipotéticas. Los recuadros indican repeticiones de ADN (marrón) o genes parciales N-terminales (blanco). Los asteriscos marcan mutaciones que alteran la pauta de los ORFs. Las líneas discontinuas indican que los cíntigos se extienden más allá de estas posiciones.

Este último operón también mostró un marco de lectura abierta (ORF), que codifica el transportador específico de citrato CitP presente en las cepas de interés para la industria de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Quintans et al., 2008). Por el contrario, en el genoma de la cepa Lc 14.4 no está presente el gen *citP* aunque se identificaron los operones cromosómicos que codifican a la citrato liasa y a la enzima maloláctica. Los genes que codifican a las correspondientes permeasas asociadas están completos y sin mutaciones. Aunque todavía no se estudiaron en detalle, se informaron cepas de *L. lactis* que utilizan citrato (y producen diacetilo) sin una permeasa CitP reconocible (Fusieger et al., 2020; Couderc et al., 2022). Por último, en el genoma de todas las cepas de *L. lactis* analizadas se encontraron genes que codifican la citrato sintasa y la isocitrato deshidrogenasa; enzimas que podrían intervenir en la síntesis de citrato (Wang et al., 2000).

Además de los sistemas génicos de utilización de lactosa y citrato, los genomas analizados mostraron un complejo conjunto de genes metabólicos involucrados en el crecimiento de las cepas en la leche y en la formación de compuestos de sabor y aroma en este medio (ANEXO IV, Tablas 2 y 3). Con solo algunas pequeñas variaciones entre las cepas, se pudieron establecer perfiles de

contenido genético específicos de especies. No obstante, estas pequeñas diferencias podrían ser críticas para el rápido desarrollo y/o la síntesis de compuestos aromáticos en leche.

Entre estos genes, cabe mencionar la presencia de genes que codifican las proteinasas caseinolíticas de *L. lactis* y *S. thermophilus* (*PrtP* y *PrtS*, respectivamente) en cinco cepas (cuatro de ellas, como se mencionó anteriormente, crecieron bien y coagularon la leche), pero no en Lc 21.1, St 9.1 y St. 21.1. El lento crecimiento en leche de la cepa Lc 19.3, que también contiene el gen *prtP*, podría originarse en las regiones reguladoras que preceden a la región codificante de la proteinasa modificando su expresión y/o la de su proteína de maduración *PrtM* esencial en *L. lactis* (Vos et al., 1989). Tras los resultados de la caracterización bioquímica, en las cuatro cepas de *S. thermophilus* se encontró un operón de ureasa completo, que consta de tres enzimas catalíticas y siete genes accesorios de función desconocida (Figura 16).



**Figura 16.** Organización genética del operón de la ureasa en el genoma de cepas de *Streptococcus thermophilus*. Código de color: en rojo, genes catalíticos de la ureasa (*ureA*, *ureB* y *ureC*); en celeste, genes accesorios; en blanco, genes que codifican proteínas hipotéticas o proteínas de otros sistemas. Las líneas punteadas indican que el cíntigo se extiende más allá del área representada. Los asteriscos marcan mutaciones que alteran los ORF.

No se identificaron *loci* asociados a sistemas CRISPR-Cas en los genomas de las cepas de *L. lactis*; siendo estos sistemas poco comunes en esta especie (Millen et al., 2012). De acuerdo con esta ausencia, se identificó una gran proporción de genes asociados a fagos en el genoma de todas las cepas de *L. lactis* (Tabla 10). El software Phaster asoció los genes fágicos identificados con fagos completos (de uno a tres) o incompletos (de 4 a 13). La presencia de profagos en el genoma de una cepa bacteriana podría inhabilitar su uso en la industria láctea (Lunde et al., 2005). Sin embargo, la ausencia total de fagos integrados en el genoma de *L. lactis* es algo sumamente improbable. Por el contrario, las cuatro cepas de *S. thermophilus* mostraron tres *loci* con repeticiones CRISPR y genes que codifican proteínas Cas. Dispersa en los genomas, también se encontró una serie corta de repeticiones CRISPR en todas las cepas excepto en St 8.1. De forma congruente, un fago completo de 43,9 kpb fue identificado únicamente en la cepa St 21.1. En el resto de las cepas sólo se detectaron dos *loci* que poseían conjuntos de genes de origen fágico pero que, por su reducido tamaño, parecían codificar

fagos incompletos. El programa informático PlasmidFinder identificó dos secuencias derivadas de plásmidos en St 9.1, mientras que la base de anotación BV-BRC detectó una proteína de replicación plasmídica en St 8.1, St 9.1 y St 18.1 (Tabla 10). La presencia de estas secuencias de ADN o proteína sugiere la presencia de plásmidos en las cepas. Sin embargo, el programa PlasmidFinder no parece ser fiable para la detección de plásmidos en especies de BAL, ya que, por ejemplo, solo detectó uno de los siete que presentó la cepa *Lpb. plantarum* LL441 (Flórez et al., 2023). A pesar de esto, el software identificó secuencias de plásmidos en todas las cepas de *L. lactis*, lo que concuerda bien con el gran número de genes que codifican proteínas asociadas a plásmidos detectadas en la anotación BV-BRC en los genomas de todas las cepas de lactococos. La identificación de un buen número de proteínas de replicación plasmídica sugiere que contienen, como otras muchas cepas de esta especie (Duarte & Monteiro, 2021), un numeroso complemento extracromosómico en forma de plásmidos.

A pesar de la ausencia de actividad antimicrobiana en el ensayo de difusión en agar, el programa informático BAGEL 4 desarrollado para la detección de secuencias involucradas en la síntesis de bacteriocinas/BLIS, identificó varios *loci* como regiones putativas que podrían codificar péptidos similares a bacteriocinas (Blp; *Bacteriocin-like peptides*) o péptidos de síntesis ribosomal con diversas modificaciones postraduccionales (RiPP; *Ribosomally synthetized and Post-translationally-modified Peptides*) (Tabla 10). Además de varias lactocinas, el genoma de Lc 14.4 codifica una secuencia proteica con homología a la enterolisina A de los enterococos (53% de identidad de aminoácidos). Tres cepas de lactococos mostraron un *locus* para la síntesis de sactipéptidos (péptidos que contienen azufre en el carbono α; clasificados como bacteriocinas de Clase Ic) (Tabla 10). Finalmente, se detectó un *locus* para la síntesis de linaridina (una clase de péptidos lineales deshidratados) en el genoma de la cepa Lc 19.3. En las cepas de *S. thermophilus*, por su parte, se identificaron varios *loci* implicados en la síntesis de bacteriocinas de clase II con un péptido líder de doble glicina. Además, todos los genomas de esta especie mostraron un *locus* para la síntesis de estréptidos (una clase de péptidos cíclicos de 20 residuos aminoacídicos con función antimicrobiana). Finalmente, la cepa St 8.1 mostró un *locus* con la capacidad de codificar una bacteriocina homóloga a la bacteriocina BhtR (un lantibiótico de dos componentes de la Clase I) producida por una cepa de *Streptococcus ratti* (Hyink et al., 2005). Algunas de estas moléculas (sactipéptidos, estréptidos) se identificaron recientemente en los genomas de las BAL con herramientas bioinformáticas y se desconoce si tienen actividad antimicrobiana o no, y, en su caso, su rango de inhibición (Bushin et al., 2020), lo que podría explicar los resultados negativos de las pruebas fenotípicas.

La exploración de los genomas con la base de datos CARD para la detección de genes de resistencia a antibióticos detectó dos secuencias idénticas en los genomas de las cuatro cepas de *S. thermophilus* con baja homología (<33% de identidad) con las proteínas deducidas respectivas de

los genes *vanT* y *vanY* de *Enterococcus* spp. Estos genes fueron anotados por la plataforma BV-BRC como alanina racemasa y D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa, respectivamente. Estas enzimas tienen una actividad biológica definida en las bacterias Gram-positivas, ya que participan en la síntesis del peptidoglucano, y los genes, por tanto, forman parte del complemento genético básico de mantenimiento (*housekeeping genes*) en *S. thermophilus*. El programa ResFinder, por su parte, no detectó genes ni mutaciones implicadas en la resistencia a antibióticos en los genomas de *S. thermophilus*. La base de datos CARD también detectó como gen de resistencia al gen que codifica a la D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa en todas las cepas de *L. lactis* como un “hit” estricto (secuencia similar a otra en la base de datos considerada un gen de resistencia a antibiótico). Además, la base de datos identificó el gen *LmrD* en todas las cepas de esta especie como un “hit” perfecto (secuencia idéntica a otra en la base de datos considerada un gen de resistencia a antibiótico: 100% de identidad, 100% de cobertura de longitud). Este gen codifica una subunidad del transportador ABC inespecífico *LmrCD* de *L. lactis*. Este transportador está bien caracterizado y participa en la secreción de compuestos nocivos para las células (Zaidi et al., 2008).

En los subsistemas del servidor Rast (servicio automatizado de anotación de genomas de bacterias y arqueas), se anotaron algunos genes que codifican enzimas implicadas en la homeostasis y la resistencia a metales pesados, pero no verdaderos genes de resistencia a antibióticos. Tampoco se identificaron genes que codificaran factores de patogenicidad o virulencia, más allá de un gen que codifica a una serín proteasa con similitud parcial a la toxina exfoliativa A de *Staphylococcus aureus*. Este gen se presentó en todas las cepas analizadas, tanto en las de *L. lactis* como en las de *S. thermophilus*. Sin embargo, su función fisiológica en las BAL está aún por determinarse (Bukowski et al., 2010). Apoyando los resultados del análisis de producción de aminas biogénas, la enzima glutamato descarboxilasa (*gadB*) fue la única descarboxilasa de aminoácidos que se identificó en el genoma de las 8 cepas analizadas.

### Conclusión parcial

Para la caracterización bioquímica y tecnológica de las cepas seleccionadas, se realizaron ensayos que incluyeron la tipificación bioquímica, fermentación de carbohidratos, determinación del perfil de actividad enzimáticas y otras pruebas relevantes para su uso como fermentos (producción de ácidos orgánicos, formación de compuestos volátiles en leche y capacidad para inhibir microorganismos patógenos o alterantes mediante compuestos antimicrobianos). En todos los casos, los resultados obtenidos coincidieron con lo esperado para sus respectivas especies.

En este estudio, la secuenciación genómica tuvo como objetivo comprender la base genética de la producción de GABA y asegurar la inocuidad alimentaria de las ocho cepas. El análisis *in silico* confirmó la identificación taxonómica de todas ellas. Además, *L. lactis* Lc 21.1 y Lc 14.4 se identificaron como pertenecientes a la biovariedad *diacetylactis*, tal como indicaron los resultados de la utilización de citrato y las pruebas bioquímicas realizadas. No se identificaron genes que codificaran factores de virulencia o toxinas en las bases de datos específicas. Estos datos sugieren que las cepas examinadas están libres de genes de riesgo para la salud, lo cual indica su seguridad para su uso en sistemas alimentarios.

En contraste con los resultados obtenidos en medios de laboratorio y leche, ninguna de las cepas produjo GABA en homogeneizados fecales, propiedad evaluada para analizar su potencial como cepas con características probióticas. Como resultado de los estudios de seguridad alimentaria, se concluye que las cepas seleccionadas no producen aminas biogénas y no portan genes que expresen resistencias a antibióticos, por lo cual se consideran seguras para la elaboración de productos lácteos.

Los resultados de la caracterización de seguridad, bioquímica, genética y tecnológica de las cepas seleccionadas indicaron que todas ellas, son potenciales constituyentes de cultivos iniciadores o cultivos adjuntos para la fabricación de productos lácteos fermentados enriquecidos con GABA a partir de leche suplementada con GMS.



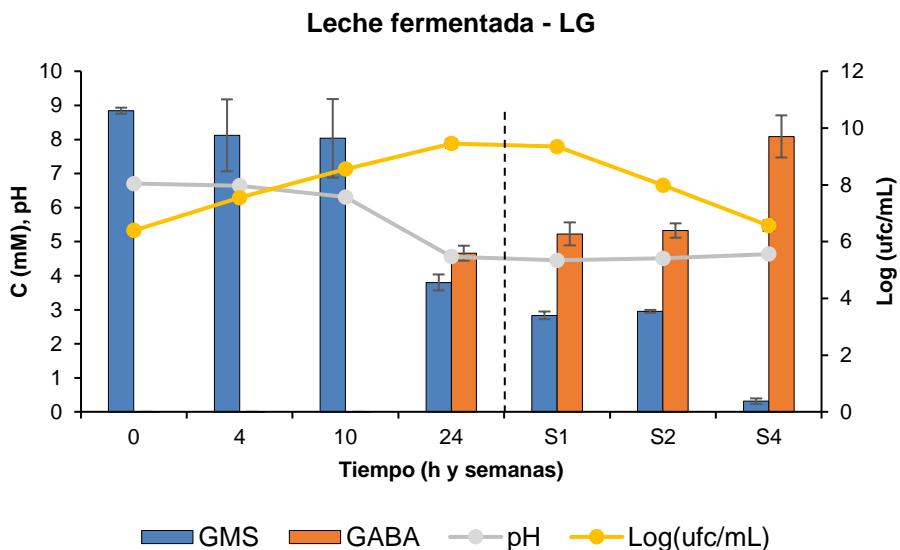
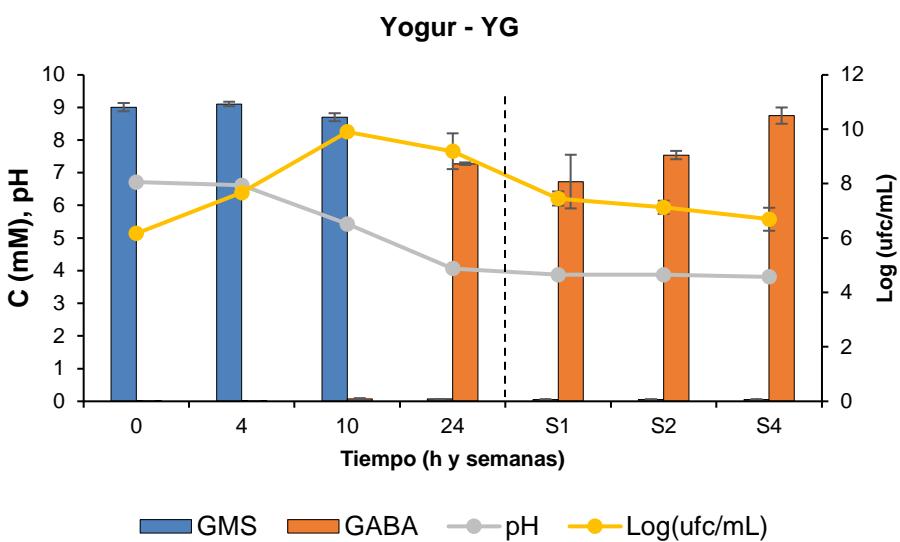
### Capítulo 3.- Elaboración de productos lácteos fermentados enriquecidos en GABA

Tras la caracterización tecnológica y de seguridad en las cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* seleccionadas por su capacidad para producir GABA, se concluyó que todas ellas se consideran potenciales constituyentes de cultivos iniciadores o cultivos adjuntos para la fabricación de productos lácteos fermentados enriquecidos en GABA. Puesto que el ambiente lácteo ejerce un efecto sobre la producción de GABA, se diseñaron cultivos iniciadores destinados a la elaboración de leche fermentada y yogur a partir de leche suplementada con GMS, evaluando tanto la producción de GABA durante el proceso de elaboración y conservación, como la aceptación por parte del consumidor de los productos enriquecidos en este compuesto.

#### 4.6. Elaboración de productos lácteos funcionales

Los cultivos iniciadores diseñados se ensayaron para la elaboración de leche fermentada (cepas de *L. lactis*) y yogur (cepas de *S. thermophilus* en combinación con cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* no productoras de GABA), siguiendo la metodología tradicional para la elaboración de leche fermentada (incubación 22°C) y de yogur (incubación a 42°C). En ambos casos, se utilizó como sustrato leche semidescremada comercial sometida a un tratamiento ST-HT: calentamiento a alta temperatura (140°C) durante un periodo muy breve (2-4 segundos). Dado que la proteólisis durante la fermentación es muy reducida, la leche se suplementó con 10 mM de GMS como precursor de GABA. Esta cantidad es inferior al límite máximo permitido (LMP) de GMS en alimentos de 10 g/kg o L ( $\approx$ 60 mM) y una ingesta diaria aceptable (IDA) de 30 mg/kg peso corporal según las recomendaciones de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA ANS Panel, 2017).

Los lotes experimentales de leches fermentadas (LFG) y yogur (YG) se compararon con otros elaborados empleando cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* no productoras de GABA como controles. La identificación y cuantificación de GABA a lo largo de la elaboración y maduración de los productos experimentales se realizaron por UHPLC y las características organolépticas de los productos fermentados se evaluaron por un panel de consumidores del IPLA-CSIC. Para correlacionar los niveles de GABA producidos y evaluar la estabilidad microbiológica del producto durante su vida útil, se llevó a cabo la caracterización microbiológica de los productos experimentales.

**A****B**

**Figura 17.** Producción de GABA a partir de GMS durante la elaboración y vida de estante a 4°C de productos lácteos: (A) leche fermentada y (B) yogur. S1, S2 y S4: semanas 1, 2 y 4 respectivamente. La línea punteada separa horas de semanas.

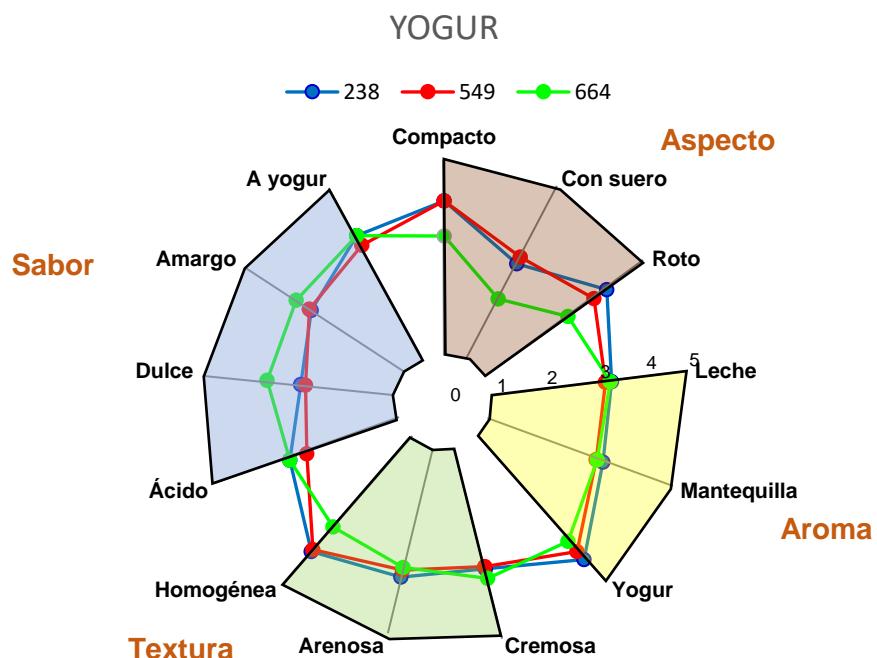
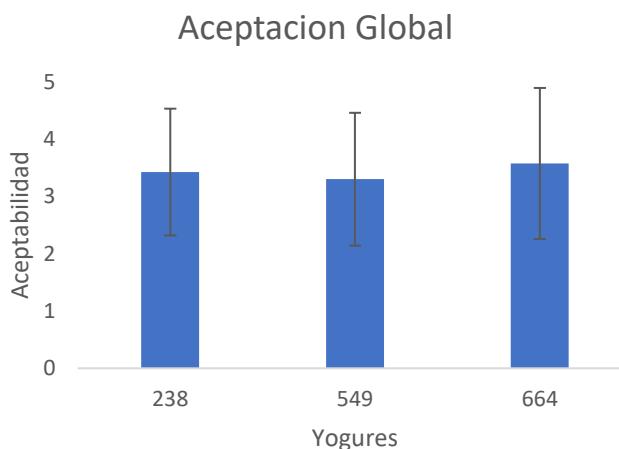
En la Figura 17, se presenta la relación entre los parámetros medidos durante la elaboración y conservación de los productos experimentales preparados con las cepas seleccionadas. En la elaboración de ambos productos, el pH disminuyó desde 6,70 hasta 4,65 en la leche fermentada y a 4,06 en el yogur, manteniéndose en esos valores durante la refrigeración a 4°C; estos son los rangos esperados para estos derivados lácteos (Aryana & Olson, 2017). Los valores de células viables expresados en unidades logarítmicas ( $\log_{10}$ ), en ambos casos aumentaron desde 6,0 (en la inoculación) hasta un valor máximo de 9,4-9,9 (tras la fermentación), para disminuir posteriormente a las 4

semanas de conservación hasta un valor de 6,5-6,6 en la leche fermentada y el yogur, respectivamente. La producción de GABA en la leche fermentada, alcanzó valores de 4,66 mM y 8,09 mM a los 28 días en condiciones de refrigeración (4°C), valores que corresponden a cantidades de 48,00-83,42 mg de GABA/100 mL de producto. Mientras que, en el yogur, se obtuvieron valores de 7,27 mM durante la elaboración y 8,75 mM a los 28 días en refrigeración. Estos valores se corresponden con un rango de 75-90 mg de GABA/100 mL de yogur, cantidades superiores a los mínimos reportados que producen efectos fisiológicos en el hombre (Inoue et al., 2003; Pouliot-Mathieu et al., 2013; Linares et al., 2016).

Basado en los resultados, se concluye que la acumulación de GABA persiste después del proceso de elaboración, específicamente durante el periodo de refrigeración, lo cual es consistente con lo reportado por otros autores (Galli et al., 2022; Ramos & Poveda, 2022). Las cepas seleccionadas, por tanto, podrían emplearse como cultivos iniciadores o adjuntos para la elaboración de productos fermentados con un proceso de maduración a baja temperatura (p. ej., en la elaboración de quesos).

#### **4.7. Análisis sensorial**

El análisis sensorial se llevó a cabo en dos etapas debido a que las cepas estaban siendo evaluadas por primera vez en la elaboración de productos fermentados. En la primera etapa, los productos fermentados se presentaron a un grupo reducido de evaluadores ( $n=5$ ). Si estos evaluadores consideraban los productos satisfactorios, se procedía a presentarlos a un grupo más amplio de panelistas ( $n=40$ ).

**A****B**

**Figura 18.** Análisis sensorial de yogur elaborado con BAL seleccionadas, utilizando una escala hedónica de 5 puntos y codificación de 3 dígitos. (A) Atributos de: sabor, aspecto, aroma y textura; (B) Aceptación global. Codificación: 238 y 549, yogur elaborado con BAL productoras de GABA sin y con el agregado de 10mM GMS, respectivamente; 664, yogur elaborado con fermento comercial sin el agregado de GMS.

En la leche fermentada, el panel reducido de evaluadores detectó la presencia de un sabor extraño, por lo que este producto no se presentó al panel extendido. El defecto pudo deberse a la presencia de sabor umami en el producto, como resultado de los residuos de glutamato monosódico (3,8 mM), muy superiores a los que se determinaron en el yogur (Figura 18). Este sabor característico de determinados alimentos asiáticos (Hajeb & Jinap, 2015), no es un atributo deseable en leches

fermentadas (Mohammadi et al., 2012). Por lo que se concluye que, bajo las condiciones de ensayo, estas cepas no son adecuadas para la elaboración de leche fermentada, aunque pudieran ser de interés para la elaboración de quesos.

En cambio, el yogur pasó el primer filtro de analistas y se continuó con el análisis sensorial por el panel de consumidores extendido mediante la evaluación de los siguientes atributos: sabor, aspecto, aroma y textura (Figura 18A). Para ello, se utilizó una escala hedónica de 5 puntos y se codificaron los yogures a analizar con dígitos de 3 cifras aleatorios (238 y 549, yogur elaborado con fermento constituido por cepas seleccionadas productoras de GABA sin y con el agregado de 10 mM GMS, respectivamente; y 664, yogur elaborado con fermento comercial sin el agregado de GMS). Mediante el análisis ANOVA ( $n=40$ ) de los atributos estudiados, pudimos concluir que no había diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ;  $p=0,4386$ ) en los valores promedio de los atributos para los yogures experimentales, incluyendo la aceptación global (Figura 18B). Por lo que el yogur enriquecido con GABA pudiera tener una buena aceptación en el mercado.

### Conclusión parcial

Se demostró la factibilidad de utilizar estas cepas BAL seleccionadas para la elaboración de productos lácteos enriquecidos con GABA. La aplicación de las cepas seleccionadas productoras, permitió la elaboración exitosa de un yogur enriquecido con buena aceptación por parte de un panel de consumidores. En el caso de la leche fermentada, la conversión de GMS a GABA fue moderada bajo las condiciones experimentales empleadas. Los resultados indicaron la necesidad de optimizar las condiciones de fermentación para mejorar la cantidad de GABA generado y minimizar el residuo del precursor, evitando el sabor umami indeseable para este tipo de productos.

El estudio de la vida útil en refrigeración de los productos enriquecidos mostró una estabilidad aceptable, con un aumento en los niveles de GABA durante el almacenamiento, alcanzando concentraciones superiores a los mínimos necesarios reportados, para producir efectos positivos en la salud humana. Estos hallazgos son prometedores para el desarrollo de productos lácteos funcionales.

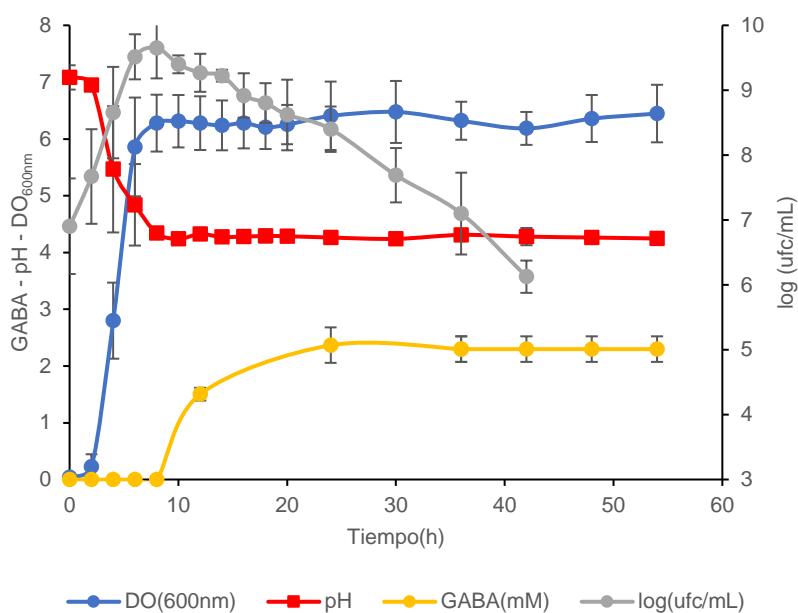
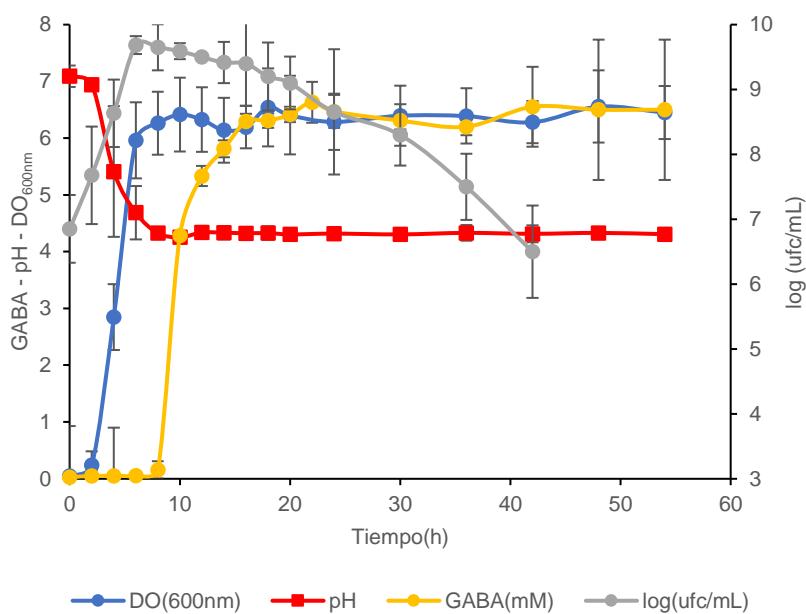
Se concluye que las cepas seleccionadas de *L. lactis* y *S. thermophilus* presentan un gran potencial para la formulación de cultivos iniciadores o adjuntos en la fabricación de alimentos lácteos fermentados enriquecidos con GABA, proporcionando una nueva opción en el mercado.

**Capítulo 4.- Caracterización y control de la producción de GABA en *S. thermophilus* St 8.1**

En la actualidad, se tiene conocimiento suficiente acerca de la producción de GABA por parte de diversas cepas de *L. lactis* (Laroute et al., 2021; Redruello et al., 2021; Galli et al., 2022) y *Lvb. brevis* (Wu & Shah, 2017; Cui et al., 2020; Zotta et al., 2022; Zhang et al., 2023). Sin embargo, con respecto a *S. thermophilus* el conocimiento es mucho más limitado (Gu et al., 2022). Por este motivo, en este apartado se seleccionó la cepa *S. thermophilus* St 8.1 -una de las más productoras consideradas en este trabajo- para evaluar el efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre la producción de GABA, junto con un análisis transcripcional de los genes GABA *gadB* y *gadC*.

**4.8. Dinámica de crecimiento, evolución del pH y producción de GABA**

Además de identificar cepas que produjeran GABA en medios de cultivo y leche, se investigaron las condiciones de su producción. Se buscó entender cuál era el rol fisiológico primario del GABA en las BAL, conocimiento que podría ser utilizado para maximizar la producción del compuesto por los microorganismos. Para alcanzar este objetivo, se monitorizaron cultivos de *S. thermophilus* St 8.1 en LM17 y LM17<sub>GMS</sub> durante un máximo de 48 h (Figura 19) y en un medio químicamente definido (CDM), desarrollado para *L. lactis* (Otto et al., 1983), que permite también un crecimiento suficiente de *S. thermophilus* (Figura 19). Este último medio permitió un mayor control de la concentración del precursor y de la producción de GABA, ya que LM17 contiene pequeñas cantidades de glutamato ( $\approx 2,0$  mM). Con este ensayo se pudo determinar la dinámica de crecimiento mediante la determinación de los valores de DO<sub>600nm</sub> y el número de células viables, así como, la variación del pH. La temperatura de incubación a la que se realizó este ensayo fue la óptima para el crecimiento de *S. thermophilus* (42°C).

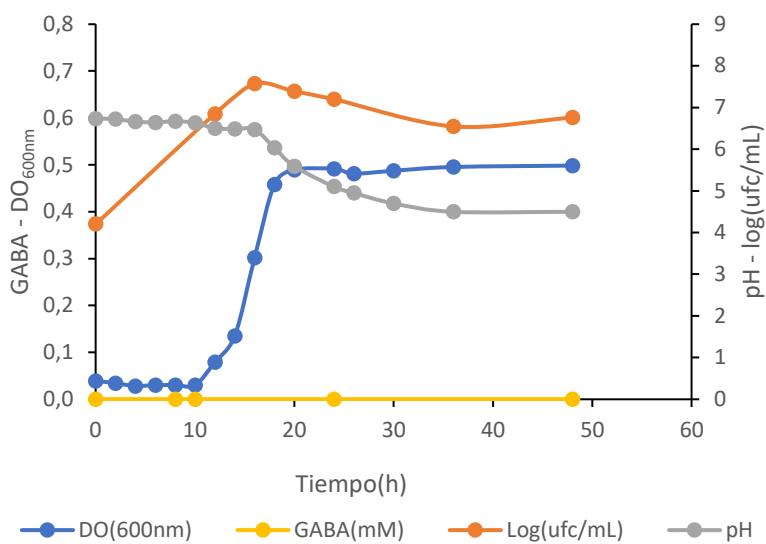
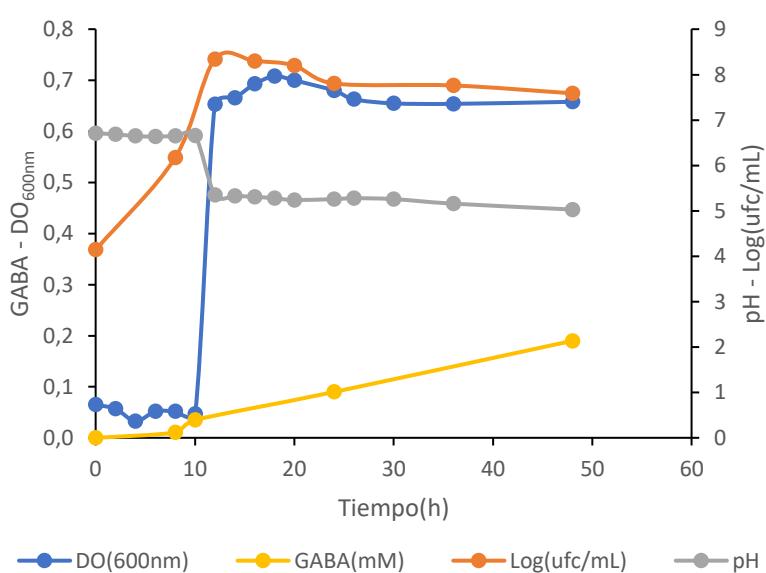
**A****B**

**Figura 19.** Dinámica de crecimiento, evolución del pH y producción de GABA a lo largo del tiempo por *Streptococcus thermophilus* St 8.1: (A) en medio LM17 y (B) en medio LM17 suplementado con 5 mM de GMS.

Los valores de DO<sub>600nm</sub> dividieron la curva de crecimiento de *S. thermophilus* St 8.1 en tres períodos diferentes, que se corresponden con los tiempos de muestreo de 0-2, 2-8 y 8- 40 h (Figura 19). Tras la inoculación, una fase de latencia muy corta y, por tanto, una fase de crecimiento exponencial temprana son propiedades valiosas desde un punto de vista tecnológico y de seguridad en los productos lácteos, ya que estas propiedades de la cepa St 8.1 permitirían una rápida acidificación y coagulación de la leche, lo cual favorece la inhibición de patógenos y microorganismos

alterantes (Linares et al., 2016; Zhu et al., 2024). La viabilidad celular comenzó a disminuir poco después de que se obtuvieron los valores máximos de recuento. La tendencia de la curva de DO<sub>600nm</sub>, los recuentos de células viables y el pH de los cultivos suplementados con GMS (5 mM) fue muy similar a la de los cultivos no suplementados. Sin embargo, a las 40 h de incubación, la viabilidad celular y el pH fueron ligeramente superiores en condiciones suplementadas ( $\approx 0,4$  log UFC/mL y 0,05 unidades, respectivamente) (Figura 19B). Tras 10 h de incubación, cuando se alcanzó la máxima DO<sub>600nm</sub>, los recuentos más altos y el pH más bajo (4,28), se detectó GABA en el medio por primera vez (Figura 19). La coincidencia entre la producción exponencial de GABA y valores pH por debajo de 5,0 respalda la potencialidad de *S. thermophilus* 8.1 para la producción de productos lácteos fermentados enriquecidos con GABA. En el medio LM17 no suplementado con GMS utilizado como control negativo, se detectó una pequeña cantidad de glutamato ( $\approx 2,0$  mM) (Figura 19A), lo cual explicaría la pequeña producción de GABA detectada en este medio. En los cultivos suplementados con GMS, la concentración de GABA aumentó exponencialmente entre las 10 y 16 h de incubación, con ligeros incrementos posteriores hasta alcanzar un valor máximo de  $6,63 \text{ mM} \pm 0,36$  a las 22 h. A partir de este tiempo la concentración de GABA se mantuvo constante hasta el final del muestreo a las 55 h (Figura 19B).

Para evaluar las cinéticas de crecimiento en medio químicamente definido (CDM) (Figura 20), se trabajó con una concentración de inóculo elevada (5%), ya que el cambio desde un medio muy rico, como es el LM17, hasta uno mínimo afectó significativamente el crecimiento de St 8.1.

**A****B**

**Figura 20.** Dinámica de crecimiento, evolución del pH y producción de GABA a lo largo del tiempo por *Streptococcus thermophilus* St 8.1: (A) en medio CDM y (B) en medio CDM suplementado con 10 mM de GMS.

De manera similar a los resultados empleando el medio LM17, en CDM la viabilidad celular y el pH fueron ligeramente superiores a las 48 h de incubación en presencia de GMS (Figura 20B). El GABA comenzó a detectarse a las 10 h de incubación, coincidiendo con los valores más altos de DO<sub>600nm</sub> y de recuentos celulares. En este punto, el pH mostró un descenso muy pronunciado, seguido de una disminución más suave, sin alcanzar el valor de la condición sin suplementar (5,0 frente a 4,5 a las 48 h) (Figura 20A). Una vez que se inició la producción de GABA (Figura 20B), continuó de manera lineal hasta el final de la incubación.

#### 4.9. Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de GABA

##### 4.9. Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de GABA

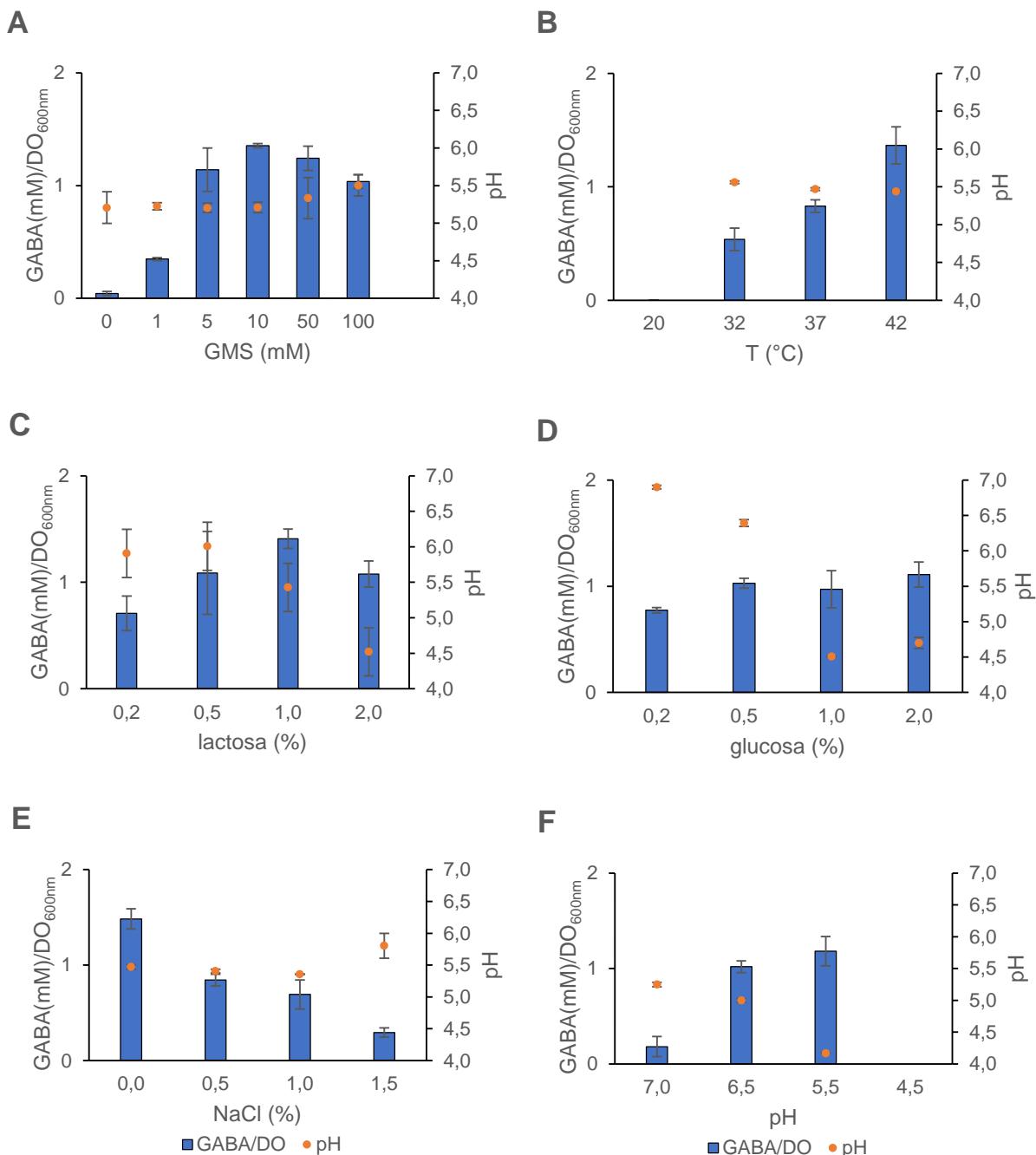
En los últimos años, se describió la influencia de distintas condiciones ambientales sobre la producción de GABA, lo cual destaca la necesidad de evaluar a nivel de cepa condiciones similares a las que tienen lugar a lo largo de los procedimientos tecnológicos de cada producto fermentado (Mazzoli et al., 2010; Chen et al., 2018; Carafa et al., 2019). Por ello, se evaluó la producción de GABA empleando *S. thermophilus* St 8.1 en medio M17 a diferentes valores de pH, temperatura de incubación y concentraciones de GMS, lactosa, glucosa y NaCl. Todos estos parámetros influyen en el crecimiento de la cepa, por tanto, el efecto de estos factores sobre la producción se representa tras normalización con los valores de DO<sub>600nm</sub> (Figura 21). Como era esperable, la producción de GABA por la cepa St 8.1 se vio notablemente influenciada por la presencia o ausencia de su precursor (GMS), pero también por condiciones que la bacteria encuentra en el ambiente lácteo (p. ej., durante la fabricación de queso y yogur), entre las que destacan la temperatura, el pH y la concentración de NaCl y lactosa.

La producción de GABA se incrementó con el aumento de la concentración de GMS (Figura 21A), alcanzando un máximo de  $6,19 \pm 0,02$  mM en medio suplementado con 10 mM de GMS (correspondiente a una relación GABA/DO<sub>600nm</sub> de  $1,36 \pm 0,08$  U). Sin embargo, la producción de GABA disminuyó significativamente a concentraciones de GMS > 10 mM. Estos valores difieren considerablemente de las concentraciones óptimas de GMS para otras cepas, como *S. thermophilus* fmb5 ( $\sim 100$  mM de GMS), *L. lactis* NCDO 2118 ( $\sim 152$  mM de GMS) o *Lpb. plantarum* K16 ( $\sim 500$  mM de GMS), entre otras. (Chen et al., 2018; Díez-Gutiérrez et al., 2022; Laroute et al., 2021). El crecimiento de *S. thermophilus* St 8.1 medido por DO<sub>600nm</sub>, fue similar en todas las concentraciones de GMS analizadas, lo cual indica que las diferencias en la producción de GABA no tienen lugar por el aumento de la densidad bacteriana.

La temperatura también afectó a la producción de GABA. La temperatura óptima para obtener un mayor rendimiento de producción de GABA se determinó a 42°C, que concuerda con la temperatura óptima de crecimiento de *S. thermophilus* (Chen et al., 2018). Aunque no se observaron diferencias contundentes en la densidad bacteriana a temperaturas inferiores (32°C y 37°C), sí se detectó una disminución significativa en la producción de GABA. Por el contrario, *S. thermophilus* no creció a 20°C, por lo cual no se detectó GABA en cultivos a esta temperatura (Figura 21B).

El efecto de la fuente de carbohidratos sobre la producción de GABA se evaluó en medio M17 suplementado con un porcentaje creciente de glucosa y lactosa (0,2-2,0%) (Figura 21C y D). El rendimiento máximo de producción de GABA se alcanzó con 1% de lactosa y 2% de glucosa. A concentraciones de azúcar superiores al 1%, la producción de GABA fue mayor en presencia de lactosa

que de glucosa. Un estudio previo determinó que la especie *S. thermophilus* muestra una ligera preferencia por lactosa en comparación con otros carbohidratos simples, como glucosa y galactosa (Tarrah et al., 2018). Esta predilección específica por el metabolismo de la lactosa afecta directamente a la producción de GABA, ya que el crecimiento de *S. thermophilus* St 8.1 se ve potenciado en medio LM17, lo cual se traduce en una mayor densidad celular y una disminución más rápida del pH.

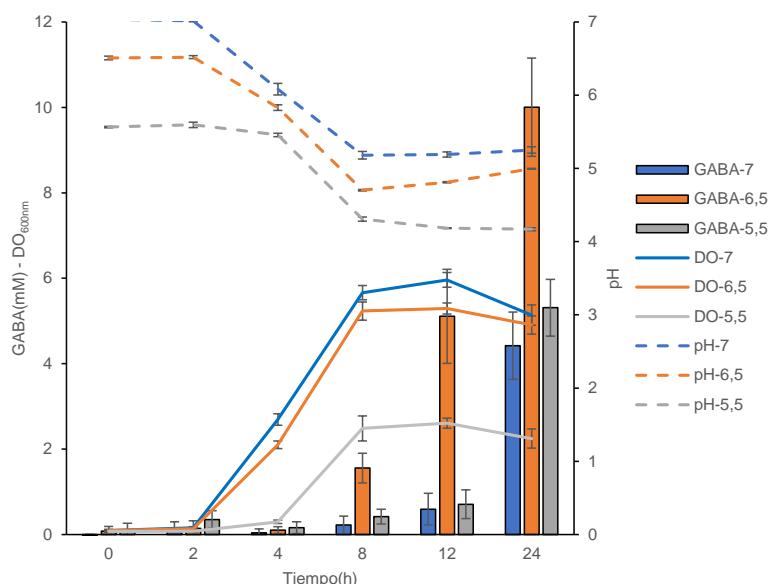


**Figura 21.** Efecto de diferentes condiciones sobre la producción de GABA por *Streptococcus thermophilus* St 8.1. La condición de cultivo control fue caldo M17 suplementado con 1% de lactosa y 10 mM de GMS, y una temperatura de incubación de 42°C. Las barras indican la concentración de GABA y los puntos indican el pH.

La presencia de NaCl en el medio de cultivo (el medio M17 no contiene NaCl en su formulación) provocó una disminución drástica en la producción de GABA, incluso cuando el crecimiento de St 8.1 no fue muy diferente al del control (0,5-1,0% de NaCl). Por lo tanto, se determinó que LM17 sin suplementación con NaCl fue la condición óptima para el rendimiento de producción de GABA por esta cepa ( $1,5 \pm 0,01$  U) (Figura 21E).

La influencia del pH sobre la producción de GABA por St 8.1 se evaluó en medio LM17<sub>GMS</sub> con un pH inicial ajustado a 7,0, 6,5, 5,5 y 4,5; posteriormente, durante la incubación, el pH evolucionó libremente. El mayor rendimiento en la producción de GABA se registró en los cultivos con un pH inicial de 5,5 ( $1,18 \pm 0,25$  U) después de 24 h de incubación (Figura 21F), mientras que a pH 7,0 se obtuvo un rendimiento menor ( $0,18 \pm 0,10$  U). Por el contrario, *S. thermophilus* St 8.1 fue incapaz de crecer en LM17<sub>GMS</sub> con un pH inicial de 4,5 y, congruentemente, no se detectó GABA en el cultivo a este pH. Aunque el valor de pH óptimo para la producción de GABA varía ligeramente entre cepas, está bien establecido que se requiere un pH inferior a 5,0 para su producción (Chen et al., 2018; Carafa et al., 2019; Laroute et al., 2021; Díez-Gutiérrez et al., 2022). Esto concuerda con la conversión del ácido glutámico en GABA como mecanismo de supervivencia en condiciones de estrés ácido (Papadimitriou et al., 2016).

Para obtener más información sobre el efecto del pH en la producción de GABA, se monitorearon cultivos en LM17<sub>GMS</sub> con pH iniciales de 7,0, 6,5 y 5,5 durante 24 horas de fermentación (Figura 22).

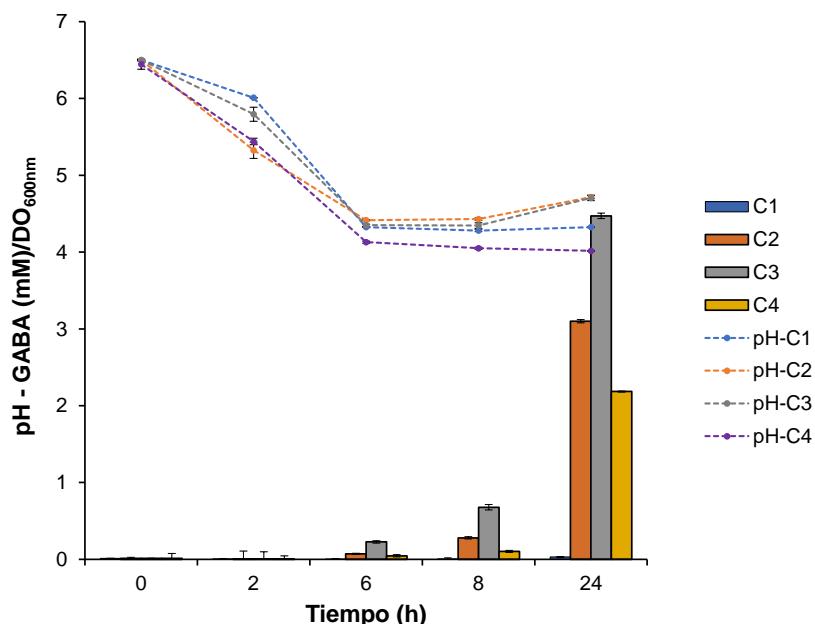


**Figura 22.** Producción de GABA, crecimiento celular y variación del pH de *Streptococcus thermophilus* St 8.1 en caldo M17 suplementado con 1% de lactosa y 10 mM de GMS a un pH inicial ajustado a 7,0; 6,5 y pH 5,5.

En los cultivos con un pH inicial de 6,5, el 100% del GMS presente en el medio se metabolizó a GABA ( $10 \text{ mM GABA} \pm 0,53$ ). Quizás esta elevada concentración de GABA esté relacionada con el ligero aumento del pH final del cultivo observado tras 24 h de incubación. Por otra parte, los porcentajes de transformación de GMS en GABA en cultivos con pH inicial de 5,5 y 7,0 fueron de 53% ( $5,31 \text{ mM GABA} \pm 0,61$ ) y 19% ( $1,87 \text{ mM GABA} \pm 0,95$ ), respectivamente. Cabe destacar que el crecimiento de St 8.1 a pH 5,5 se vio seriamente comprometido alcanzando valores de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  50 veces inferiores a los obtenidos a pH 7,0 y pH 6,5.

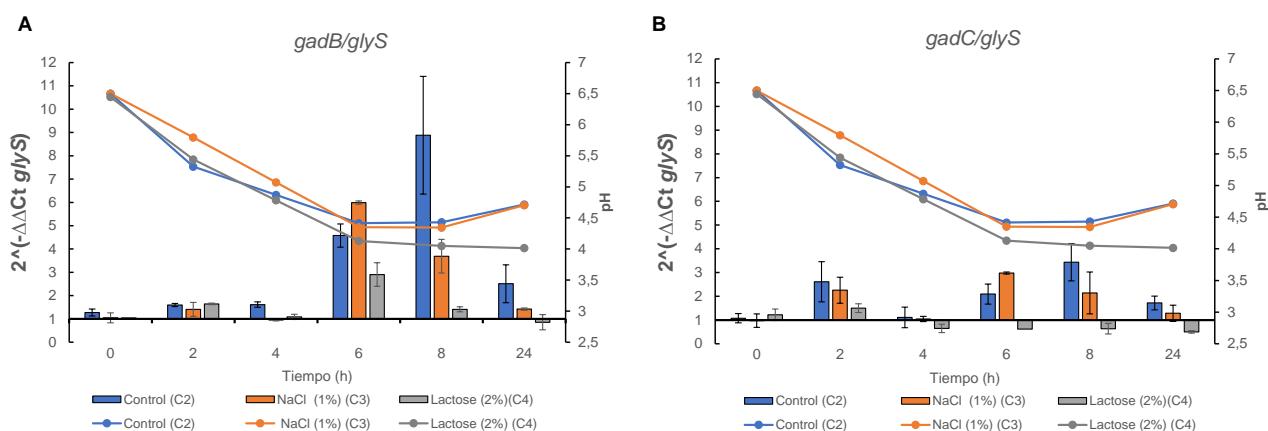
#### 4.10. Regulación transcripcional de los genes *gad*

La composición y estructura del operón *gad* en *S. thermophilus* está bien establecida y comprende los genes *gadB* y *gadC*, que codifican una glutamato descarboxilasa y un intercambiador glutamato/GABA, respectivamente. Sin embargo, los mecanismos de regulación que controlan los genes *gad* continúan poco comprendidos. En este trabajo se investigó la regulación transcripcional de los genes *gad* y la concomitante producción de GABA por *S. thermophilus* St 8.1 en condiciones que se pueden encontrar en la fabricación y maduración de algunos productos lácteos fermentados (1% de NaCl y 2% de lactosa). Debido a la presencia de pequeñas cantidades de glutamato en el medio M17, la expresión de los genes *gad* se determinó en medio químicamente definido (CDM), según el siguiente esquema: condición 1 (C1), CDM; condición 2 (C2), CDM<sub>GMS</sub>; condición 3 (C3), CDM<sub>GMS</sub> suplementado con NaCl al 1% y condición 4 (C4), CDM<sub>GMS</sub> suplementado con lactosa al 2%.



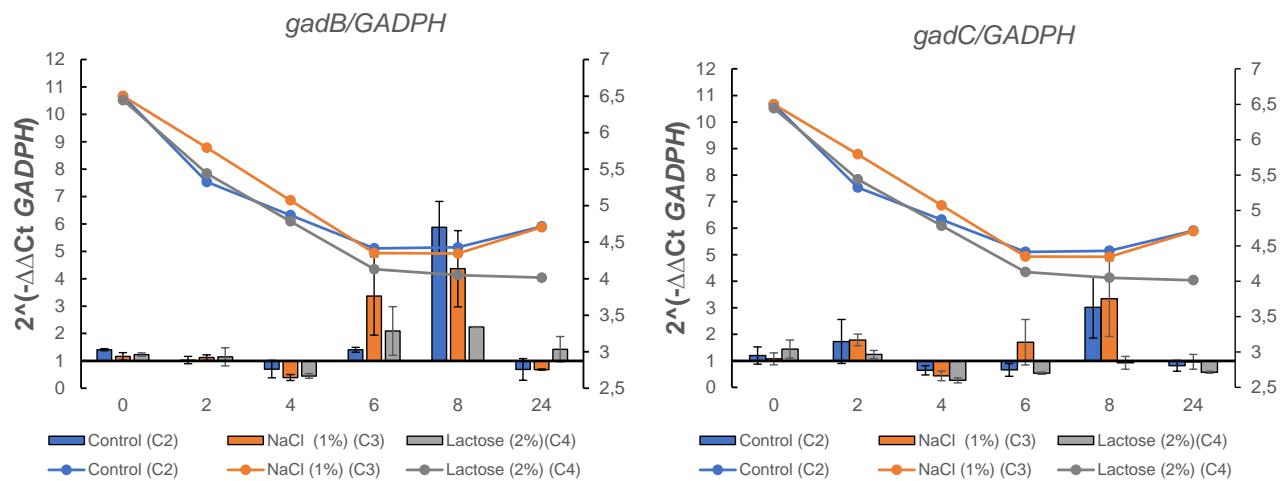
**Figura 23.** Producción de GABA y evolución del pH en los cultivos de *Streptococcus thermophilus* St 8.1 en diferentes condiciones: C1, CDM; C2, CDM<sub>GMS</sub>; C3, CDM<sub>GMS</sub> suplementado con 1% NaCl y C4, CDM<sub>GMS</sub> suplementado con 2% lactosa.

Los cultivos de *S. thermophilus* St 8.1 en medio CDM<sub>GMS</sub> no mostraron diferencias significativas ( $p<0,05$ ), en el crecimiento en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 23), excepto en presencia de 2% de lactosa, donde se registró un aumento de DO<sub>600nm</sub> de 0,5 unidades. En medio CDM suplementado con GMS (C2) se detectó GABA después de 6 h de incubación. La producción de GABA en este medio aumentó con la adición de 1% de NaCl (C3), mientras que se redujo con la adición de 2% de lactosa (C4). La presencia de diversas sales (iones cloruro, sulfato o fosfato), fuente de nitrógeno (extracto de levadura), coenzimas (piridoxal-5'-fosfato) y otros aditivos influyen positiva o negativamente en la producción de GABA dependiendo de la cepa y de las condiciones específicas de cultivo (Laroute et al., 2021; Cataldo et al., 2024). Este hecho, podría explicar el efecto opuesto del NaCl y la lactosa en la producción de GABA por St 8.1 cuando se utilizaron los medios LM17<sub>GMS</sub> y CDM<sub>GMS</sub>. En todas las condiciones ensayadas, solamente se detectó GABA cuando el pH disminuyó a valores menores a 5,0. Es preciso resaltar que al igual que en los cultivos en M17, el pH final de los cultivos con mayor contenido en GABA fue aproximadamente 0,5 unidades mayor que el de los cultivos con menor contenido.



**Figura 24.** Expresión de los genes *gadB* (A) y *gadC* (B) de *Streptococcus thermophilus* St 8.1 mediante RT-qPCR y cuantificación del efecto de NaCl al 1% y lactosa al 2%. Las barras muestran la expresión relativa de los genes después de la normalización con el gen de mantenimiento de la subunidad β de la glicina-ARNt ligasa (*glyS*) y con la expresión en la condición de referencia (CDM sin GMS; C1). Las líneas indican la evolución del pH en los cultivos.

La transcripción de los genes *gadB* y *gadC* se cuantificó mediante RT-qPCR a distintos intervalos de incubación 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h, intentando evaluar la expresión de estos genes en todas las etapas de la fase de crecimiento de St 8.1 (Figura 19). En la Figura 24, se muestra el nivel de expresión relativa de *gadB* y *gadC* en *S. thermophilus* St 8.1 después de la normalización con la expresión del *glyS* (un gen conservado de mantenimiento) y también con la expresión de los genes *gad* en CDM sin GMS (calibrador). Cuando se utilizó el gen de mantenimiento *GADPH* para la normalización, se obtuvo el mismo patrón de expresión y unos valores similares (Figura 25).



**Figura 25.** Expresión de los genes *gadB* (A) y *gadC* (B) de *Streptococcus thermophilus* St 8.1 mediante RT-qPCR y cuantificación del efecto de NaCl al 1% y lactosa al 2%. Las barras muestran la expresión relativa de los genes después de la normalización con el gen de mantenimiento de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*) y con la expresión en la condición de referencia (CDM sin GMS; C1). Las líneas indican la evolución del pH en los cultivos.

En presencia de GMS, la transcripción de los dos genes siguió los mismos patrones de expresión en todas las condiciones ensayadas. Se determinó una transcripción basal pequeña de *gadB* y *gadC* durante el crecimiento en el medio de control (CDM<sub>GMS</sub>; C2). La expresión de *gadB* aumentó sustancialmente a las 6 h, alcanzó un máximo a las 8 h (8 veces) y aún a las 24 h (≈3 veces). Por el contrario, la transcripción de *gadC* siguió una curva bimodal. Aumentó a las 2 h (2,5 veces), disminuyó fuertemente a las 4 h y aumentó nuevamente a las 6 h de incubación. La transcripción de los dos genes se vio afectada por la presencia de NaCl (condición C3) o lactosa (condición C4) en el medio de crecimiento. En comparación con el control (C2), la transcripción de *gadB* y *gadC* en el medio suplementado con 1% de sal fue mayor a las 6 h y menor en todos los demás puntos de muestreo, mientras que la presencia de lactosa añadida disminuyó la transcripción de los dos genes en todos los puntos de muestreo. En particular, la expresión de *gadC* en esta condición disminuyó a niveles menores al constitutivo en las condiciones de cultivo estándar sin glutamato monosódico (C1).

El efecto del pH sobre la expresión del gen *gadB* se reportó previamente para cepas de otras especies de BAL, como *Lpb. plantarum* 90sk (Yunes et al., 2016), *L. lactis* NCDO 2118 (Laroute et al., 2021) y *E. avium* SDMCC050406 (Gu et al., 2021). Aunque el pH puede actuar como el interruptor que activa el operón GABA en presencia de GMS en la cepa St 8.1, el NaCl y la lactosa también mostraron, de diferentes maneras, algunos efectos sobre la transcripción y la producción de GABA. En comparación con el control, la presencia de NaCl mejoró moderadamente la expresión de los genes *gadB* y *gadC* durante la fase estacionaria temprana. Esto se correlaciona con un mayor rendimiento de la producción de GABA en el medio CDM suplementado con sal. Este resultado concuerda también con los datos de la literatura, ya que otros autores reportaron un efecto positivo de los iones cloruro en la expresión de *gadBC* en *Lactococcus* (Laroute et al., 2021). De la misma forma, se determinaron

también efectos positivos de la sal en la expresión de genes que codifican para otras descarboxilasas, como la de la tirosina descarboxilasa (*tdcA*) y la histidina descarboxilasa (*(hdcA)*) en *S. thermophilus* (La Gioia et al., 2011; Rossi et al., 2011). Por otra parte, la adición de un 2% de lactosa a los cultivos de CDM<sub>GMS</sub> condujo a una represión significativa de la transcripción de *gadB* y *gadC*, lo que resultó en una reducción en la producción de GABA, a pesar de producirse un aumento del crecimiento bacteriano. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio transcripcional en el que se evalúa el efecto de la lactosa en la expresión de los genes *gad*. Sin embargo, un estudio previo realizado con otra enzima descarboxilasa de la ruta de biosíntesis de la putrescina en *Lactococcus* reportó la represión catabólica ejercida por la lactosa (del Río et al., 2015; Linares et al., 2013). Al igual que en los estudios referenciados, el análisis de la secuencia aguas arriba del codón de inicio de *gadC* identificó una secuencia (5'-TGATTAAACGATATGA-3') similar a la secuencia consenso de un sitio *cre* (secuencia de acción *cis* en la proximidad del inicio de la transcripción de genes reprimidos por catabolitos) consenso en *S. thermophilus*, 5'-TGWNANCNTNWCA-3' (Gasser et al., 2024). Esta evidencia sugiere que el operón *gad* también podría estar regulado por represión catabólica a través del represor CcpA o de un represor similar (Warner y Lolkema, 2003).

### Conclusión parcial

Se investigó la producción de GABA en la cepa *Streptococcus thermophilus* St 8.1 bajo diferentes condiciones de cultivo, junto con un análisis transcripcional de los genes *gadB* y *gadC*. Esta cepa demostró tener un gran potencial tecnológico para la fermentación de la leche debido a su capacidad de crecimiento rápido y acidificación eficaz, lo cual es crucial para la elaboración de productos lácteos seguros y de calidad.

Los estudios revelaron que la producción de GABA por *S. thermophilus* St 8.1 está fuertemente influenciada por varios factores ambientales, tales como la presencia de GMS, la temperatura, el pH, la sal (NaCl) y la concentración de lactosa. La producción óptima de GABA se observó con el agregado de 10 mM de GMS y a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa (42°C). Sin embargo, en las condiciones del ensayo, la lactosa parece reprimir la expresión de los genes *gadB* y *gadC* y, en consecuencia, tiene una influencia negativa en la producción de GABA.

Además, se estableció que el pH es un factor crítico que actúa como un interruptor para la activación del operón GAD, permitiendo la producción de GABA cuando el pH es inferior a 5. La presencia de NaCl también influyó positivamente en la expresión y producción de GABA. Estos resultados, sin embargo, hay que tomarlos con precaución, dado que, ocasionalmente, fueron distintos para una misma condición en LM17 y en CDM.

Por ello se concluye que, la cepa St 8.1 muestra un efectivo potencial para la elaboración de productos lácteos fermentados enriquecidos en GABA. Si bien, para maximizar la producción de GABA en los productos lácteos sería necesario optimizar las condiciones de producción en leche, algo que no evaluamos en este trabajo. Con todo esto, los resultados proporcionan una base inicial para futuras investigaciones en el campo de los alimentos funcionales con beneficios para la salud.

# **Discusión general**



## 5. Discusión general

El trabajo de esta Tesis Doctoral se enmarca en uno de los objetivos del Grupo de Investigación “Cultivos Lácteos Funcionales” del IPLA-CSIC, en cuyo seno se llevaron a cabo la mayor parte de las investigaciones que se recogen en esta memoria. El objetivo principal del grupo es identificar y seleccionar microorganismos beneficiosos para su inclusión en sistemas lácteos, como fermentos, cultivos adjuntos o probióticos. Para ello, se realizó el cribado de las cepas de las colecciones procedentes de diversos productos lácteos fermentados tradicionales y del tracto gastrointestinal humano, para evaluar distintas propiedades tecnológicas y de probiosis con el fin de seleccionar las más adecuadas para diversas aplicaciones en productos lácteos (Sánchez et al., 2000; Delgado et al., 2002; Delgado et al., 2008; Delgado et al., 2015).

En este trabajo se evaluó la capacidad para producir GABA en un elevado número de cepas BAL de diversos géneros y especies aisladas de leche y productos lácteos argentinos y españoles. Además, se llevó a cabo la identificación y tipificación de las cepas seleccionadas, seguido de su caracterización en términos bioquímicos y genéticos, así como en los aspectos tecnológicos y de seguridad alimentaria. Entre las cepas productoras, se seleccionaron ocho, de las cuales cuatro pertenecen a la especie *L. lactis* subsp. *lactis* (dos de ellas de la biovariedad *diacetilactis*); y las otras cuatro a la especie *Streptococcus thermophilus*. Una vez caracterizadas, estas cepas se utilizaron para la elaboración de productos lácteos fermentados, esperando obtener un producto enriquecido en GABA, un compuesto bioactivo con posibilidades de influir positivamente en la salud. De esta forma, se combinaron las funciones tecnológicas y probióticas en los mismos microorganismos, para lograr como producto resultante un alimento funcional. Con el fin de alcanzar este propósito, se evaluó la factibilidad de estas cepas para la producción de alimentos, en concreto un yogur y una leche fermentada, y se realizó el análisis de aceptación de los mismos por un panel de consumidores. Finalmente, se efectuó el estudio de la regulación de la transcripción de los genes *gad* en una cepa de *S. thermophilus* productora de GABA, proporcionando una comprensión integral de los mecanismos involucrados en la producción de este compuesto bioactivo. Esta información permite no solo entender mejor el potencial funcional de estas cepas, sino también optimizar el proceso de elaboración de productos lácteos funcionales enriquecidos en GABA y, de esta manera, contribuir a la salud y el bienestar de los consumidores.

### 5.1. El GABA y los productos lácteos funcionales

Aunque no existe una definición legal de este término, los Alimentos Funcionales son los que, además de los beneficios nutritivos, proporcionan otros que contribuyen al mantenimiento o mejora del estado de salud de los consumidores (Khalaf et al., 2021). Los alimentos funcionales

buscan mejorar trastornos crónicos como la enfermedad celíaca, el síndrome metabólico, la prevención del cáncer, las enfermedades relacionadas con la inflamación y la mejora del rendimiento mental. Además, a partir de la pandemia de COVID-19, las personas buscan también alimentos que mantengan o mejoren su sistema inmunológico (Damián et al., 2022). Esta búsqueda es más importante, si cabe, en un momento en el cual los consumidores son cada vez más conscientes de la relación que existe entre dieta y salud, lo que ofrece oportunidades de mercado a los productos con atributos funcionales (Damián et al., 2022). En este contexto, es importante destacar que, entre las pocas alegaciones funcionales admitidas por las Agencias Reguladoras, dos de ellas involucran al yogur. En primer lugar, la actividad lactasa que aportan las cepas responsables de la fermentación de la leche en este producto, *S. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mejorando la digestión de la lactosa en personas intolerantes (EFSA NDA Panel, 2010). En segundo lugar, una alegación más reciente indica que el consumo regular de yogur puede reducir el riesgo de padecer diabetes de tipo II (FDA, 2024).

Los productos enriquecidos en GABA podrían promover, al menos en parte, los beneficios que este compuesto aporta a nuestro organismo y que incluyen, entre otros, una disminución de la presión arterial, lo cual contribuye a reducir la hipertensión, la modulación de la función renal y la reducción del estrés psicológico, actuando, en este último caso, como un tranquilizante (Icer et al., 2024). De esta forma, los productos cuyo consumo, en las proporciones de una dieta balanceada, aporten cantidades de GABA capaces de causar efectos fisiológicos en los consumidores se puedan considerar alimentos funcionales. Por esta razón, la industria alimentaria está interesada en la producción de alimentos enriquecidos en GABA. Más allá de la adición exógena del compuesto, en los productos lácteos fermentados existe la posibilidad de producción de GABA si en la matriz existe ácido glutámico libre (para lo cual se precisa de una elevada proteólisis previa) y microorganismos con actividad glutamato descarboxilasa. De forma alternativa, el precursor de GABA (ácido glutámico) puede ser añadido de manera exógena a la leche (o a otras materias primas a fermentar), por ejemplo, en forma de GMS (Sun et al., 2009; Linares et al., 2016), y transformarse en el compuesto bioactivo mediante la intervención de microorganismos que posean esta capacidad. Éstos, podrían proceder de la microbiota natural de la leche, de los cultivos iniciadores o de los cultivos adjuntos y de maduración (Dhakal et al., 2012). La adición de cultivos (fermentos o adjuntos) productores de GABA, como los seleccionados en este trabajo, permite que el proceso de síntesis del compuesto se pueda llevar a cabo de forma eficiente y predecible. Sin embargo, por el momento, las grandes empresas de fermentos no cuentan con cepas de BAL que incluyan esta característica, por lo cual resulta oportuna la búsqueda y selección de cepas productoras con las que las industrias del sector lácteo de Argentina y España

puedan aumentar su competitividad, mediante la oferta de productos fermentados con una clara orientación hacia la salud del consumidor.

En el Capítulo 1 de esta Tesis, se analizaron aislados provenientes mayoritariamente de leche y productos lácteos tradicionales elaborados con leche cruda, sin el uso de cultivos iniciadores en busca de aquellos con capacidad para producir GABA a partir de GMS. Para llevar a cabo este análisis, se emplearon dos metodologías: una, utilizando un método enzimático-espectrofotométrico y otra, mediante técnicas cromatográficas. A partir de estos aislados, y tras la tipificación de las cepas, se seleccionaron ocho (cuatro de cada especie) para una caracterización completa posterior. Ésta, incluyó aspectos bioquímicos, genéticos, tecnológicos y de seguridad alimentaria. Este enfoque sistemático y exhaustivo permitió identificar cepas que no solo son adecuadas para la elaboración de productos lácteos fermentados, sino que también cumplen con los estándares de seguridad alimentaria, lo cual las hace idóneas para su uso en la industria.

### **5.2. *L. lactis* y *S. thermophilus* como fermentos**

La fermentación es una de las técnicas más antiguas de conservación de alimentos y una forma sencilla de obtener productos con nuevas características organolépticas y funcionales. De hecho, es posible fermentar la leche para producir cientos de productos diferentes, entre los que se incluyen numerosos tipos de leches fermentadas y quesos (Mayo et al., 2010). De manera tradicional, la fermentación de la leche se lleva a cabo de forma espontánea por los microorganismos nativos de la materia prima; en particular, por el desarrollo de diversas especies de BAL. En la actualidad, las fermentaciones espontáneas de los alimentos se reemplazaron por la adición de cepas BAL bien caracterizadas (cultivos iniciadores o fermentos), las cuales desarrollan este proceso de forma eficiente y predecible (Parente et al., 2017). El crecimiento de las BAL promueve una rápida reducción del pH (acidificación) que genera el marco físico-químico en el que se va a producir la conservación y maduración de los productos lácteos fermentados. Al mismo tiempo, la acidificación inhibe el desarrollo de numerosos microorganismos alterantes y patógenos, por lo que los productos lácteos fermentados resultantes tienen una mayor vida útil y se vuelven más seguros desde el punto de vista higiénico sanitario. Finalmente, el crecimiento de las BAL desempeña también un rol en la digestión de los componentes nutricionales de la leche aumentando su biodisponibilidad, participan en la síntesis de algunas vitaminas (como la de los grupos B y K), posibilitan el desarrollo de compuestos de aroma y sabor deseables, y la formación de moléculas con actividades funcionales, como GABA o CLA (Mayo & Alonso, 2015).

*L. lactis* y *S. thermophilus* son las especies constituyentes de fermentos más importantes desde el punto de vista económico, ya que ambas se utilizan ampliamente como fermentos para quesos (Parente et al., 2017). *S. thermophilus* es también uno de los componentes de los fermentos

para la elaboración de yogur, en combinación, como se mencionó, con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. El empleo de cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* (o de otras especies de BAL) como fermentos requiere el análisis exhaustivo de sus propiedades, incluyendo buenas aptitudes tecnológicas (rápido crecimiento en leche, producción de aromas deseables, resistencia a bacteriófagos, entre otros) y la ausencia de características indeseables como la producción de aromas y sabores extraños, la presencia de genes de resistencia a antibióticos transmisibles, la producción de compuestos tóxicos como las aminas biogénas, entre otros (Abedin et al., 2024). Es importante también que resistan las exigentes condiciones que se presentan durante la producción industrial de fermentos (elevada producción de biomasa, buen crecimiento en medios de cultivo de bajo costo, resistencia a la desecación o congelación, entre otros). En general, los fermentos comerciales contienen un conjunto de cepas (entre 5 y 15) en cada tipo de fermento (Parente et al., 2017), de modo que la selección de fermentos es una tarea a largo plazo y compleja pero muy necesaria para contar con fermentos adecuados para las diversas aplicaciones industriales.

En este trabajo, luego de la selección de cepas productoras de GABA, se realizó la caracterización de un grupo de cepas BAL correspondiente a las especies de *L. lactis* y *S. thermophilus*. Los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica y tecnológica de las cepas seleccionadas (Capítulo 2), fueron congruentes con lo esperado para estas especies destinadas a la elaboración de productos lácteos fermentados y al diseño de fermentos. La secuenciación genómica tuvo como objetivo principal descifrar la base genética responsable de la producción de GABA, así como garantizar la seguridad alimentaria de las cepas seleccionadas. Los datos obtenidos indicaron que se encuentran libres de genes que podrían representar un riesgo para la salud de los consumidores, lo que respalda su uso seguro en sistemas alimentarios. De esta manera, se asegura que las cepas no solo son eficaces en la producción de GABA, sino también seguras y estables para su aplicación en la industria alimentaria y potenciales constituyentes para ser utilizadas como cultivos iniciadores o adjuntos. El estudio de diversas características fenotípicas y genéticas de este grupo de cepas productoras, permitió la selección de ocho que se propusieron como fermentos para la elaboración de leches fermentadas (Capítulo 3) de tipo mesófilo (cepas de *L. lactis*) y para yogur (cepas de *S. thermophilus*). Las cepas estudiadas de esta última especie resultaron ser capaces de generar yogures de calidad comparable al de yogures comerciales preparados con cepas industriales y, al mismo tiempo, producir GABA a partir de la adición de GMS a la leche. Este yogur Enriquecido recibió buena aceptación por parte de un panel de consumidores.

Por su parte, las cepas de *L. lactis* generaron sabores extraños durante la fermentación de la leche suplementada, lo que resulta, seguramente, de la poca eficiencia de transformación del GMS añadido en las condiciones ensayadas. Debido a esto, la leche fermentada Enriquecida no obtuvo

la misma aceptación por el panel que el yogur, lo cual podría deberse a la presencia de GMS residual, que confirió un marcado sabor extraño (umami) a este producto. Lo expuesto pone de manifiesto la necesidad de optimizar las condiciones de fermentación para aumentar la cantidad de GABA producido y reducir al mínimo los residuos del precursor. El estudio de la vida útil en refrigeración de los productos enriquecidos mostró una estabilidad aceptable, con un incremento en los niveles de GABA durante el almacenamiento. Las concentraciones alcanzadas superaron los mínimos necesarios para generar efectos positivos en la salud humana de acuerdo con reportes previos (Inoue et al., 2003; Pouliot-Mathieu et al., 2013; Linares et al., 2016). Estos hallazgos son alentadores para el desarrollo de productos lácteos funcionales enriquecidos en GABA.

En este trabajo, no se identificaron cepas superproductoras de GABA de las especies *L. lactis* y *S. thermophilus* como las descritas en otros trabajos (Renes et al., 2019; Redruello et al., 2021). Sin embargo, la producción de GABA por las cepas seleccionadas en esta Tesis podría maximizarse mediante el empleo de diversas estrategias, como la optimización de las condiciones de cultivo en las cuales se genere una mayor producción (Edalatian Dovom et al., 2023), o estrategias de Ingeniería Genética (Monteiro et al., 2024). De hecho, la clonación y sobreexpresión de los genes *gad* en algunas de las cepas se contemplan en la propuesta de trabajo inicial de esta Tesis. Sin embargo, esta experiencia no se pudo llevar a cabo debido a la falta de tiempo, y se considera como uno de los posibles trabajos a futuro.

Las cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* productoras de GABA seleccionadas, podrían ser adecuadas no solo para la elaboración de leches fermentadas, sino también para la fabricación de otros productos lácteos; en particular, quesos. La maduración de este tipo de derivados lácteos implica la conversión de las proteínas de la leche en péptidos y aminoácidos libres mediante un proceso lento que involucra a todos los componentes del sistema proteolítico (Fox et al., 2017). La producción de ácido glutámico en forma lenta como resultado de la proteólisis, podría facilitar la conversión de éste en GABA, reduciendo la formación de compuestos de aroma y sabor extraños. Sin embargo, este uso tendrá que demostrarse experimentalmente, contemplado en el Plan de Tesis y que no se abordó por las limitaciones que impuso la aparición de la pandemia de Covid 19. El resto de las cepas no productoras de GABA o de baja producción, pasarán a formar parte de las colecciones de BAL disponibles y, tras su caracterización, podrán utilizarse como componentes de fermentos acidificantes y de maduración para otras aplicaciones (p.ej., cultivos iniciadores generales para queso, yogur, entre otros).

### 5.3. El GABA en la fisiología celular de las BAL

La producción de GABA en los productos fermentados se puede incrementar mediante la utilización de cepas de especies de BAL superproductoras (Sun et al., 2009; Renes et al., 2019; Cui

et al., 2020). En este sentido, entre las cepas más productoras se encuentran algunas de la especie *Levilactobacillus brevis* (Cui et al., 2020). Sin embargo, las cepas de esta especie no crecen bien en leche y, cuando lo hacen, producen excesiva cantidad de gas, por lo que no son adecuadas para la elaboración de productos lácteos (Parente et al., 2017). Además, de forma frecuente, *Lvb. brevis* posee actividad descarboxilasa de otros aminoácidos, lo que resulta en la producción de aminas biógenas (Coton y Coton, 2009). Otra estrategia para incrementar la producción de GABA en los productos lácteos podría pasar por conocer el rol del GABA en la fisiología celular, de manera que se pudieran buscar condiciones que maximicen su producción. La síntesis de GABA, así como la descarboxilación de otros aminoácidos, es un mecanismo que utilizan los microorganismos para mantener la homeostasis del pH intracelular y contrarrestar el efecto deletéreo de la acidificación del medio (Krulwich et al., 2011). Esta acidificación es un efecto consustancial con el desarrollo de las BAL durante la fermentación, de manera que esta actividad está más que justificada en los productos lácteos fermentados. El rendimiento de GABA durante el crecimiento de los microorganismos productores se ve afectado, también, por factores como la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa específica de cada microorganismo y las condiciones de cultivo o fermentación (Yogeswara et al., 2020).

La regulación de la expresión de los genes *gad*, descrita principalmente para la especie *L. lactis*, en la que el regulador transcripcional *gadR* activa la expresión de los genes *gadC* y *gadB* en respuesta a la presencia de glutamato en el medio de crecimiento (Sanders et al., 1998; Mazzoli et al., 2010). Además, la producción de GABA por *L. lactis* se incrementa notablemente a pH ácido (Sanders et al., 1998). De forma más reciente, también se determinó la regulación en *Lvb. brevis* (Gong et al., 2019; Cataldo et al., 2024). Este tipo de estudios puede proporcionar indicios sobre otras posibilidades para incrementar la producción del compuesto bioactivo, como el aumento del inóculo, la adición de una cantidad óptima de precursor, la fermentación en varios pasos, la inmovilización celular, o la ingeniería genética de las cepas productoras (Pannerchelvan et al., 2023). Sin embargo, hasta el momento, no hay estudios sobre la regulación de los genes involucrados en la producción de GABA en cepas de *S. thermophilus*, y son pocos los trabajos en los que se analizan los factores que afectan a la síntesis de GABA por esta especie (Han et al., 2020). Comprender el papel de estos factores posibilita aumentar la producción natural de GABA por *S. thermophilus* en productos lácteos fermentados como los quesos o mediante la adición de GMS durante la elaboración de yogur. Por este motivo, en este trabajo de Tesis se llevó a cabo el estudio de la expresión a nivel transcripcional de los genes *gadB* y *gadC* de una de las cepas seleccionadas: *S. thermophilus* St 8.1 (Capítulo 4). La expresión de estos genes y su efecto en la producción de GABA se evaluaron en condiciones que simulan algunas etapas en la elaboración de productos

lácteos. Los estudios mostraron que la producción de GABA por *S. thermophilus* St 8.1 está fuertemente influenciada por varios factores ambientales, como la presencia de GMS, la temperatura, el pH, la sal (NaCl) y la concentración de lactosa. Además, se estableció que el pH es un factor crucial que actúa como interruptor para la activación del operón GAD, permitiendo la producción de GABA cuando el pH es inferior a 5,0. La presencia de NaCl también tuvo un impacto positivo en la expresión de genes y producción de GABA, mientras que la lactosa mostró un efecto opuesto, reduciendo significativamente la transcripción de los genes involucrados en la síntesis. Estos hallazgos subrayan la importancia de optimizar las condiciones de cultivo para mejorar la producción de GABA en *S. thermophilus* St 8.1, lo que podría tener aplicaciones importantes en la elaboración de productos lácteos funcionales enriquecidos en GABA. La comprensión del modo en que factores tales como el pH, la temperatura, la concentración de sal y la presencia de lactosa afectan la producción de GABA es esencial para maximizar el rendimiento y la eficiencia en la producción.

#### **5.4. Limitaciones del trabajo y proyecciones a futuro**

En este trabajo se analizó la producción de GABA en una colección de cepas de BAL procedentes de leche y diversos productos lácteos tradicionales argentinos y españoles, elaborados con leche cruda y sin la adición de fermentos. Esta capacidad se podría ensayar en nuevos aislados de otras fuentes (otros productos lácteos, vegetales fermentados, intestino de peces y otros animales) tratando de identificar cepas con una mayor capacidad de producción. En este sentido, cabe destacar la capacidad productiva de GABA de las cepas de *S. thermophilus* aisladas del intestino de peces de origen marino (Linares et al., 2016) o las aisladas de koumiss (Han et al., 2020). Las ocho cepas seleccionadas, *L. lactis* Lc 5.5, Lc 14.4, Lc 19.3 y Lc 21.1, y *S. thermophilus* St 8.1, St 9.1, St 18.1 y St 21.1, se encuentran bien caracterizadas y en condiciones para su transferencia al sector productivo, lo que podría incluir empresas lácteas o empresas de fermentos. Las cepas de *L. lactis* productoras de GABA resultaron inadecuadas para la elaboración de leches fermentadas adicionadas con GMS en las condiciones ensayadas, ya que produjeron sabores extraños e indeseables, debido seguramente, a los perceptibles residuos de glutamato presentes en el producto final. En este contexto, resulta necesario ensayar las cepas para la elaboración de quesos y comprobar que son adecuadas para ese cometido. Es esperable que lo sean, al menos para quesos con largos períodos de maduración, en los que la generación de ácido glutámico libre se lleva a cabo de forma lenta, lo que podría facilitar su conversión a GABA. En los derivados lácteos experimentales, yogur y leche fermentada, se observó que la conversión de GMS a GABA continúa durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración, lo cual fundamenta la posibilidad mencionada en el párrafo precedente. Sin embargo, su caracterización bioquímica,

fenotípica y genómica no asegura la manufactura de un producto final aceptable sensorialmente, por lo cual se hace necesario comprobar su idoneidad de forma empírica.

Desde el aspecto de investigación básica, se destaca el estudio de la utilización eficiente del citrato de la leche por la cepa *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* Lc 14.4, en cuyo genoma fue imposible identificar el gen que codifica el transportador específico de citrato CitP, y el rol que, en este sentido, podrían tener los cotransportadores de citrato/H<sup>+</sup> identificados. Asimismo, aunque se inició la caracterización de la regulación de la producción de GABA en *S. thermophilus*, se identificó la necesidad de mayor numero de trabajos para completar esta caracterización. Se identificaron algunas incongruencias entre los resultados obtenidos en medio de cultivo M17 y los obtenidos en el medio mínimo CDM, tanto en lo que respecta a la expresión de los genes *gadB* y *gadC*, tanto en distintas concentraciones de sal como en distintas concentraciones de azúcar y, en particular, de lactosa. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la composición específica de cada medio de cultivo, a los efectos de los distintos nutrientes o a las distintas condiciones de estrés osmótico. Finalmente, merece también una atención especial la observación de que el operón de GABA en *S. thermophilus* pudiera estar sujeto a represión catabólica por la fuente de carbono a través de CcpA u otro represor similar. En estas condiciones de control, cobra más sentido la clonación de los genes *gad* bajo el control de promotores no sujetos a represión catabólica en cepas huésped adecuadas para su sobreexpresión. Aunque la utilización de microorganismos modificados genéticamente en alimentos es complicada por cuestiones regulatorias, la información que se obtenga de estas experiencias podría aplicarse a la obtención de mutantes por técnicas genéticas convencionales o servir para formular otras hipótesis con las cuales incrementar la producción de GABA por cepas y especies de BAL.

# Conclusiones



## 6. Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas en el presente trabajo de Tesis Doctoral se pueden resumir en los siguientes puntos:

1.- Se analizó la producción de GABA en 310 aislados de diversas especies de BAL procedentes de leche y productos lácteos tradicionales. La producción de GABA por estos aislados (79%) en medios suplementados con GMS fue moderada y fluctuó entre 1,01 y 6,29 mM.

2.- Entre las cepas más productoras, se seleccionaron 8, cuatro de la especie *L. lactis* y cuatro de la especie *S. thermophilus*. Estas cepas se sometieron a una completa caracterización posterior, incluyendo aspectos bioquímicos, genéticos, tecnológicos y de seguridad alimentaria. Todas ellas presentan propiedades de seguridad adecuadas y características tecnológicas que las hacen aptas para formar parte de cultivos iniciadores en productos lácteos fermentados.

3.- La demostración experimental de la producción de GABA en productos lácteos fermentados, se llevó a cabo en leche adicionada con GMS. Las cepas de la especie *L. lactis* se utilizaron para la elaboración de una leche fermentada y las cepas de *S. thermophilus*, en combinación con cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, se emplearon en la elaboración de yogur. En ambos productos se demostró la producción de GABA. Además, el yogur resultó bien aceptado sensorialmente, no así en la leche fermentada en la que se produjeron sabores extraños debido a la actividad que presentaron las cepas de *L. lactis*.

4.- Se inició la caracterización molecular de la producción de GABA por la cepa *S. thermophilus* St 8.1. El estudio transcripcional realizado, demostró la influencia de diversos parámetros relacionados con la elaboración y maduración de productos lácteos sobre la expresión génica y la producción de GABA. En particular, queda claro que el pH ácido juega un rol clave para activar el sistema de producción, mientras que la concentración de sal o la fuente de carbono pueden tener gran influencia en ambos procesos.

5.- Los resultados obtenidos podrán servir de base inicial para continuar las investigaciones con el objetivo de formular nuevos cultivos lácticos funcionales que podrían utilizarse en un futuro en la producción de derivados lácteos enriquecidos en GABA, con potencial de ofrecer beneficios para la salud, abriendo así nuevas oportunidades en el mercado de los alimentos funcionales.



# Referencias



## 7. Referencias

- Abarquero, D., Renes, E., Fresno, J. M. & Tornadijo, M. E. (2022). Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 16–26. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15227>
- Abedin, M. M., Chourasia, R., Phukon, L. C., Sarkar, P., Ray, R. C., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2024). Lactic acid bacteria in the functional food industry: Biotechnological properties and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(29), 10730-10748. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2227896>
- Alegría, Á., González, P., Delgado, S., Flórez, A. B., Hernández-Barranco, A. M., Rodríguez, A. & Mayo, B. (2016). Characterization of the technological behavior of mixtures of mesophilic lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses made of raw milk without added starters. *International Journal of Dairy Technology*, 69(4), 507–519. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12253>
- Ammor, M. S., Belén Flórez, A. & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24(6), 559–570. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.11.001>
- Anisimova, M., & Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic biology*, 55(4), 539-552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J. M. & Medina, M. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *BioMed Research International*. 2015(1), 584183. <https://doi.org/10.1155/2015/584183>
- Aryana, K. J. & Olson, D. W. (2017). A 100-Year review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987–10013. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981>
- Awasti, N. & Anand, S. (2020). The role of yeast and molds in dairy industry: An update. In J. Minj, V. A. Sudhakaran & A. Kumari (Eds.), *Dairy Processing: Advanced Research to Applications*. (pp. 243-262). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4>
- Aydogdu, T., O'Mahony, J. A. & McCarthy, N. A. (2023). pH, the fundamentals for milk and dairy processing: A review. *Dairy*, 4(3), 395–409. <https://doi.org/10.3390/dairy4030026>
- Ayivi, R. D. & Ibrahim, S. A. (2022). Lactic acid bacteria: an essential probiotic and starter culture for the production of yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(11), 7008-7025. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16076>

- Azari, S. R., Hojjatoleslamy, M., Mousavi, Z. E., Kiani, H. & Jalali, S. M. A. (2022). Production and optimization of conjugated linoleic and eicosapentaenoic acids by *Bifidobacterium lactis* in cold-pressed soybean cake. *Frontiers in Nutrition*, 9(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.916728>
- Barbosa, J. R., da Silva, S. B., da Silva Martins, L. H., Bezerra, F. W. F., Freitas, L. C., Ferreira, M. C. R. & de Carvalho Junior, R. N. (2021). Microbial degradation of food products. In M.I. Ahamed & R. Prasad. (Eds.), *Recent Advances in Microbial Degradation*. Springer. (pp. 155–172). [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-16-0518-5\\_6](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-16-0518-5_6)
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F. & Stanton, C. (2012).  $\gamma$ -aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 411–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x>
- Bates, M. & Clark, S. (2023). Mold-ripened cheeses. In S. Clark, M. Drake & K. Kaylegian (Eds.), *The Sensory Evaluation of Dairy Products*. Springer. (pp. 545–570). [https://doi.org/10.1007/978-3-031-30019-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-031-30019-6_17)
- Bautista, A. G. & Barrado, A. G. (2023). Bacteriocinas como bioconservador alimentario: Características generales y aplicación en alimentos. *PubSaúde*, 12, 1–9. <https://doi.org/10.31533/pubsaudel12.a366>
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadafa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P. & Weber, P. (2009). Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11–12), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: an update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4), 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Björkroth, J., Dicks, L. M., Endo, A. & Holzapfel, W. H. (2014). The Genus *Leuconostoc*. In W. H. Holzapfel & B. J. Wood (Eds.), *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy*. Wiley-Blackwell (pp. 391–404). <https://doi.org/10.1002/9781118655252>
- Bormann, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 21(1), 151–153. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01413-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01413-3)
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelaars, S. & Hansen, E. B. (2012a). Food fermentations:

- Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154 (3) 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.003>
- Bourdichon, F., Berger, B., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A. & Hansen, E. B. (2012b). Safety demonstration of microbial food cultures (MFC) in Fermented Food Products. *Bulletin of the International Dairy Federation*, (455). <http://www.ukidf.org/documents/Bulletin455.pdf>
- Breit, S., Kupferberg, A., Rogler, G. & Hasler, G. (2018). Vagus nerve as modulator of the brain-gut axis in psychiatric and inflammatory disorders. *Frontiers in Psychiatry*, 9(3). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00044>
- Breitenwieser, F., Doll, E. V., Clavel, T., Scherer, S. & Wenning, M. (2020). Complementary use of cultivation and high-throughput amplicon sequencing reveals high biodiversity within raw milk microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 11(7), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01557>
- Bukowski, M., Wladyka, B. & Dubin, G. (2010). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, 2, 1148–1165. <https://doi.org/10.3390/toxins2051148>
- Bushin, L. B., Covington, B. C., Rued, B. E., Federle, M. J. & Seyedsayamdst, M. R. (2020). Discovery and biosynthesis of streptosactin, a sactipeptide with an alternative topology encoded by commensal bacteria in the human microbiome. *Journal of the American Chemical Society*, 142(38), 16265–16275. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c05546>
- Cadwallader, K. & Singh, T. (2009). Flavours and Off-Flavours in Milk and Dairy Products. In P. McSweeney & P. Fox (Eds.), *Advanced dairy chemistry*. (pp 631–690). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_14)
- Capozzi, V., Fragasso, M., Romaniello, R., Berbegal, C., Russo, P. & Spano, G. (2017). Spontaneous food fermentations and potential risks for human health. *Fermentation*, 3(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040049>
- Carafa, I., Stocco, G., Nardin, T., Larcher, R., Bittante, G., Tuohy, K. & Franciosi, E. (2019). Production of naturally  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched cheese using the dairy strains *Streptococcus thermophilus* 84C and *Lactobacillus brevis* DSM 32386. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00093>
- Carr, F. J., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>

- Carrillo Inungaray, M. L. & Reyes Munguía, A. (2014). Vida útil de los alimentos. *CIBA Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 2(3), 32. <https://doi.org/10.23913/ciba.v2i3.20>
- Cataldo, P. G., Urquiza Martínez, M. P., Villena, J., Kitazawa, H., Saavedra, L. & Hebert, E. M. (2024). Comprehensive characterization of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production by *Levilactobacillus brevis* CRL 2013: Insights from physiology, genomics, and proteomics. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1408624. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1408624>
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F. & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, 47, 45–61. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001>
- Chen, L., Alcazar, J., Yang, T., Lu, Z. & Lu, Y. (2018). Optimized cultural conditions of functional yogurt for  $\gamma$ -aminobutyric acid augmentation using response surface methodology. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 10685–10693. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15391>
- Coton, E. & Coton, M. (2009). Evidence of horizontal transfer as origin of strain-to-strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*, 26, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.009>
- Cotter, P. D. & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(3), 429-453. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.3.429-453.2003>
- Couderc, C., Laroute, V., Coddeville, M., Caillaud, M.A., Jard, G., Raynaud, C., Cocaign-Bousquet, M., Tormo, H., & Daveran-Mingot, M.-L. (2022). Harnessing diversity of *Lactococcus lactis* from raw goat milk: Design of an indigenous starter for the production of Rocamadour, a French PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 379, 109837. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109837>
- Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S. & Qu, X. (2020). Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030995>
- Damián, M. R., Cortes-Perez, N. G., Quintana, E. T., Ortiz-Moreno, A., Garfias Noguez, C., Cruceño-Casarrubias, C. E., Sánchez Pardo, M. E. & Bermúdez-Humarán, L. G. (2022). Functional foods, nutraceuticals and probiotics: A focus on human health. *Microorganisms*, 10(5), 1065. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051065>

- DeBeeR, J., Bell, J. W., Nolte, F., Arcieri, J. & Correa, G. (2021). Histamine limits by country: A survey and review. *Journal of Food Protection*, 84(9), 1610-1628. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-129>
- del Rio, B., Ladero, V., Redruello, B., Linares, D. M., Fernández, M., Martín, M. C. & Alvarez, M. A. (2015). Lactose-mediated carbon catabolite repression of putrescine production in dairy *Lactococcus lactis* is strain dependent. *Food Microbiology*, 48, 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.018>
- Delgado, S., Delgado, T. & Mayo, B. (2002). Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *Journal of food protection*, 65(10), 1590-1596. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1590>
- Delgado, S., Leite, A. M., Ruas-Madiedo, P. & Mayo, B. (2015). Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp. strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 5, 766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00766>
- Delgado, S., O'sullivan, E., Fitzgerald, G. & Mayo, B. (2008). In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species and selection of new probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 1119-1127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03642.x>
- Denman, S. E. & McSweeney, C. S. (2006). Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(3), 572–582. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x>
- Dhakal, R., Bajpai, V. K. & Baek, K. H. (2012). Production of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1230–1241. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400001>
- Diana, M., Tres, A., Quílez, J., Llombart, M. & Rafecas, M. (2014). Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. *LWT*, 56(2), 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.027>
- Díez-Gutiérrez, L., San Vicente, L., Sáenz, J., Barron, L. J. R. & Chávarri, M. (2022). Characterisation of the probiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* K16 and its ability to produce the postbiotic metabolite  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Journal of Functional Foods*, 97, 105230. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105230>
- Duarte, S. O. D. & Monteiro, G. A. (2021). Plasmid replicons for the production of pharmaceutical-grade pDNA, proteins and antigens by *Lactococcus lactis* cell factories. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms22031379>

- Duranti, S., Ruiz, L., Lugli, G.A., Tames, H., Milani, C., Mancabelli, L., Mancino, W., Longhi, G., Carnevali, L., Sgoifo, A., Margolles, A., Ventura, M., Ruas-Madiedo, P. & Turroni, F. (2020). *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Science Reports*, 10, 14112. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70986-z>
- Edalatian Dovom M. R., Habibi Najafi M. B., Rahnama Vosough P., Norouzi N., Ebadi Nezhad S. J. & Mayo B. (2023). Screening of lactic acid bacteria strains isolated from Iranian traditional dairy products for GABA production and optimization by response surface methodology. *Science Reports*, 13(1):440. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27658-5>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with improved accuracy and speed. In *Proceedings. 2004 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference. (CSB 2004)* (pp. 728-729). IEEE. <https://doi.org/10.1109/CSB.2004.1332560>
- EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food). (2017). Re-evaluation of glutamic acid (E 620), sodium glutamate (E 621), potassium glutamate (E 622), calcium glutamate (E 623), ammonium glutamate (E 624) and magnesium glutamate (E 625) as food additives. *EFSA Journal*, 15(7), e04910. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4786>
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards) (2011). Scientific Opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10):2393. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed). (2018). Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16, 5206. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 8: 1763. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.176>
- Essa, M. M., Bishir, M., Bhat, A., Chidambaram, S. B., Al-Balushi, B., Hamdan, H., Govindarajan, N., Freidland, R. P. & Qoronfleh, M. W. (2023). Functional foods and their impact on health. *Journal of Food Science and Technology*, 60(3), 820–834. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05193-3>
- FDA (Food and Drug Administration). (2024). Response Letter for the Petition for a Qualified Health Claim for Yogurt and Reduced Risk of Type 2 Diabetes Mellitus (Docket No. FDA-2019-P-1594). Food and Drug Administration. (<https://www.fda.gov/media/176608/download?attachment>).

- Felis, G. E. & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44–61. <https://www.caister.com/backlist/ciim/v/v8/05.pdf>
- Fernández, M., Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V. & Alvarez, M. A. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: Correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*, 74(3), 276–282. <https://doi.org/10.1017/S0022029907002488>
- Flórez, A. B., Vázquez, L., Rodríguez, J. & Mayo, B. (2023). Phenotypic and safety assessment of the cheese strain *Lactiplantibacillus plantarum* LL441, and sequence analysis of its complete genome and plasmidome. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010605>
- Fooks, L. J. & Gibson, G. R. (2003). Mixed culture fermentation studies on the effects of symbiotic on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe*, 9(5), 231–242. [https://doi.org/10.1016/S1075-9964\(03\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S1075-9964(03)00043-X)
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. (2017). Microbiology of cheese ripening. In P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 333–390). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_6)
- Franciosi, E., Carafa, I., Nardin, T., Schiavon, S., Poznanski, E., Cavazza, A., Larcher, R. & Tuohy, K. M. (2015). Biodiversity and γ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/625740>
- Fusco, V., Chieffi, D., Fanelli, F., Logrieco, A. F., Cho, G. S., Kabisch, J., Böhnlein, C. & Franz, C. M. A. P. (2020). Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2013–2049. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12568>
- Fusieger, A., Martins, M. C. F., de Freitas, R., Nero, L. A. & de Carvalho, A. F. (2020). Technological properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* obtained from dairy and non-dairy niches. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 313–321. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00182-3>
- Galli, V., Venturi, M., Mari, E., Guerrini, S. & Granchi, L. (2022). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in fermented milk by lactic acid bacteria isolated from spontaneous raw milk fermentation. *International Dairy Journal*, 127, 105284. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105284>

- García-Díez, J., & Saraiva, C. (2021). Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052544>
- Gasser, C., Faurie, J. M. & Rul, F. (2024). Regulation of lactose, glucose and sucrose metabolisms in *S. thermophilus*. *Food Microbiology*, 121, 104487. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104487>
- Gholami-Shabani, M., Shams-Ghahfarokhi, M. & Razzaghi-Abyaneh, M. (2023). Food microbiology: Application of microorganisms in food industry. In M. S. Arshad & W. Khalid (Eds.), *Health Risks of Food Additives: Recent Developments and Trends in Food Sector* (pp. 148-176). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109729>
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I. & García-Romero, E. (2007). Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3), 608-613. <https://doi.org/10.1021/jf062820m>
- Gong, L., Ren, C. & Xu, Y. (2019). Deciphering the crucial roles of transcriptional regulator GadR on gamma-aminobutyric acid production and acid resistance in *Lactobacillus brevis*. *Microbial Cell Factories*, 18, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1157-2>
- González, B., Arca, P., Mayo, B. & Suárez, J. E. (1994). Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2158–2163. <https://doi.org/10.1128/aem.60.6.2158-2163.1994>
- Gu, X., Zhang, R., Zhao, J., Li, C., Guo, T., Yang, S., Han, T. & Kong, J. (2022). Fast-acidification promotes GABA synthesis in response to acid stress in *Streptococcus thermophilus*. *Food Science and Technology-LWT*, 164(6), 113671. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113671>
- Gu, X., Zhao, J., Zhang, R., Yu, R., Guo, T. & Kong, J. (2021). Molecular analysis of glutamate decarboxylases in *Enterococcus avium*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.691968>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hajeb, P. & Jinap, S. (2015). Umami taste components and their sources in Asian foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(6), 778–791. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.678422>

- Han, M., Liao, W. yan, Wu, S. mao, Gong, X. & Bai, C. (2020). Use of *Streptococcus thermophilus* for the in-situ production of  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 98–105. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16856>
- Hepsomali, P., Groeger, J. A., Nishihira, J. & Scholey, A. (2020). Effects of oral gamma-aminobutyric acid (GABA) administration on stress and sleep in humans: a systematic review. *Frontiers in Neuroscience*, 14(9). <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00923>
- Higuchi, T., Hayashi, H. & Abe, K. (1997). Exchange of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *Journal of Bacteriology*, 179(10), 3362–3364. <https://doi.org/10.1128/jb.179.10.3362-3364.1997>
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Ehrlich, S. D., Guédon, E., Monnet, V., Renault, P. & Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 435–463. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.008>
- Hyink, O., Balakrishnan, M. & Tagg, J. R. (2005). *Streptococcus ratus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS Microbiology Letters*, 252(2), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.003>
- Icer, M. A., Sarikaya, B., Kocyigit, E., Atabilen, B., Çelik, M. N., Capasso, R., Ağagündüz D. & Budán, F. (2024). Contributions of gamma-aminobutyric acid (GABA) produced by lactic acid bacteria on food quality and human health: current applications and future prospects. *Foods*, 13(15), 2437. <https://doi.org/10.3390/foods13152437>
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M. & Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European journal of clinical nutrition*, 57(3), 490-495. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601555>
- Irkin, R. (2019). Natural fermented beverages, In, A.M. Grumezescu & A.M. Holban (Eds.), *Natural Beverages*. (pp. 399–425). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816689-5.00014-6>
- ISAPP, International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (2014). *Probiotics*. <https://isappscience.org/for-scientists/resources/probiotics/>

- Iskandar, C. F., Cailliez-Grimal, C., Borges, F. & Revol-Junelles, A. M. (2019). Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. *Trends in Food Science and Technology*, 88(2), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.020>
- International Organization for Standardization & International Dairy Federation. (2010). Leche y productos lácteos: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos aplicables a bifidobacterias y bacterias lácticas no enterocólicas (BAL) (ISO 10932 | IDF 223:2010). ISO. <https://www.iso.org/standard/46434.html>
- International Organization for Standardization & International Dairy Federation. (2023). Milk and milk products – Sensory analysis – Part 2: Methods for sensory evaluation (ISO 22935-2 | IDF 99-2:2023). ISO. <https://www.iso.org/es/contents/data/standard/08/45/84532.html>
- Johnston, G. A. R. & Beart, P. M. (2024). Milestone review: GABA, from chemistry, conformations, ionotropic receptors, modulators, epilepsy, flavonoids, and stress to neuro-nutraceuticals. *Journal of Neurochemistry*, 168(7), 1179–1192. <https://doi.org/10.1111/jnc.16087>
- Katan, M. B. & De Roos, N. M. (2004). Promises and problems of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(5), 369–377. <https://doi.org/10.1080/10408690490509609>
- Khalaf, A. T., Wei, Y., Alneamah, S. J. A., Al-Shawi, S. G., Kadir, S. Y. A., Zainol, J. & Liu, X. (2021). What is new in the preventive and therapeutic role of dairy products as nutraceuticals and functional foods?. *BioMed research international*, 2021(1), 8823222. <https://doi.org/10.1155/2021/8823222>
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K. & Kot, A. M. (2021). Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, 26(7). <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>
- Koeuth, T., Versalovic, J. & Lupski, J. R. (1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research*, 5(4), 408–418. <https://doi.org/10.1101/gr.5.4.408>
- Korcz, E. & Varga, L. (2021). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 110(11), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945–960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Krulwich, T. A., Sachs, G. & Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 330-343. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2549>

- La Gioia, F., Rizzotti, L., Rossi, F., Gardini, F., Tabanelli, G. & Torriani, S. (2011). Identification of a tyrosine decarboxylase gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and analysis of its expression and tyramine production in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1140-1144. <https://doi.org/10.1128/AEM.01928-10>
- Ladero, V., Martín, M. C., Redruello, B., Mayo, B., Flórez, A. B., Fernández, M. & Alvarez, M. A. (2015). Genetic and functional analysis of biogenic amine production capacity among starter and non-starter lactic acid bacteria isolated from artisanal cheeses. *European Food Research and Technology*, 241(3), 377–383. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2469-z>
- Lányi, B. (1987). Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods in Microbiology*, 19(3), 1–67. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70407-0](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70407-0)
- Laroute, V., Aubry, N., Audonnet, M., Mercier-Bonin, M., Daveran-Mingot, M. L. & Cocaign-Bousquet, M. (2023). Natural diversity of lactococci in γ-aminobutyric acid (GABA) production and genetic and phenotypic determinants. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02181-4>
- Laroute, V., Mazzoli, R., Loubière, P., Pessione, E. & Cocaign-Bousquet, M. (2021). Environmental conditions affecting GABA production in *Lactococcus lactis* NCDO 2118. *Microorganisms*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010122>
- Li, H., Gao, D., Cao, Y. & Xu, H. (2008). A high γ-aminobutyric acid-producing *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai. *Annals of Microbiology*, 58, 649-653. <https://doi.org/10.1007/BF03175570>
- Li, Q., Tao, Q. Y., Teixeira, J. S., Shu-Wei Su, M. & Gänzle, M. G. (2020). Contribution of glutaminases to glutamine metabolism and acid resistance in *Lactobacillus reuteri* and other vertebrate host adapted lactobacilli. *Food Microbiology*, 86(11), 103343. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103343>
- Li, S., Xu, L., Qing, J., Wu, X., Li, H., Chen, H. & Liu, X. (2023). Multiple biological activities and biosynthesis mechanisms of specific conjugated linoleic acid isomers and analytical methods for prospective application. *Food Chemistry*, 409. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135257>
- Linares, D. M., del Río, B., Ladero, V., Redruello, B., Martín, M. C., Fernández, M. & Alvarez, M. A. (2013). The putrescine biosynthesis pathway in *Lactococcus lactis* is transcriptionally regulated by carbon catabolic repression, mediated by *CcpA*. *International Journal of Food Microbiology*, 165(1), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.021>

- Linares, D. M., O'Callaghan, T. F., O'Connor, P. M., Ross, R. P. & Stanton, C. (2016). *Streptococcus thermophilus* APC151 strain is suitable for the manufacture of naturally GABA-enriched bioactive yogurt. *Frontiers in Microbiology*, 7(11), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01876>
- Loman, N. J. & Pallen, M. J. (2015). Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 787–794. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3565>
- Lu, X., Chen, Z., Gu, Z. & Han, Y. (2008). Isolation of γ-aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochemical Engineering Journal*, 41(1), 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.03.005>
- Lunde, M., Aastveit, A.H., Blatny, J.M. & Nes, I.F. (2005). Effects of diverse environmental conditions on ΦLC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 721–727. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.721-727.2005>
- Mättö, J., Malinen, E., Suihko, M. L., Alander, P., Palva, A. & Saarela, M. (2004). Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 459–470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02340.x>
- Mayo Pérez, B. (2010). Productos lácteos del siglo XXI: Conjugando tradición e innovación. ACTA/CL: Asociación de Científicos y Tecnólogos de Alimentos de Castilla y León, (41), 11-16. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3433010>
- Mayo, B. & Alonso, L. (2015). Health Benefits of Fermented Dairy Products. In J.P. Tamang (Ed.), *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages* (Chapter 5, pp. 231-259). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18279>
- Mayo, B., Ammor, M. S., Delgado, S. & Alegría, A. (2010). Fermented Milk Products. In J. P. Tamang & K. Kilasapathy (Eds.), *Fermented Food and Beverages of the World*. (Chapter 9. pp. 263-288). Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/EBK1420094954>
- Mayo, B., Rodríguez Álvarez, J., Vázquez, L. & Flórez García, A. B. (2023). Microbiota de la leche y los productos lácteos. In E. Verlag (Ed.), *La microbiota en el ámbito veterinario y su modulación* (pp. 303-312). Ergon. <http://hdl.handle.net/10261/351126>
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L. & Flórez, A. B. (2021). Microbial interactions within the cheese ecosystem and their application to improve quality and safety. *Foods*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/foods10030602>
- Mazzoli, R., Pessione, E., Dufour, M., Laroute, V., Giuffrida, M. G., Giunta, C., Cocaign-Bousquet, M. & Loubière, P. (2010). Glutamate-induced metabolic changes in *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during

- GABA production: Combined transcriptomic and proteomic analysis. *Amino Acids*, 39(3), 727–737. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0507-5>
- Meier-Kolthoff, J. P. & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition*, 130(4), 1007S-1015S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1007s>
- Mileriene, J., Aksomaitiene, J., Kondrotiene, K., Asledottir, T., Vagarud, G. E., Serniene, L. & Malakauskas, M. (2023). Whole-genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL16 confirms safety, probiotic potential, and reveals functional traits. *Microorganisms*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041034>
- Millen, A. M., Horvath, P., Boyaval, P. & Romero, D. A. (2012). Mobile CRISPR/Cas-Mediated bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis*. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051663>
- Mohammadi, R., Sohrabvandi, S. & Mohammad Mortazavian, A. (2012). The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 399–409. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100125>
- Mokoena, M. P., Omatola, C. A. & Olaniran, A. O. (2021). Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules*, 26(22). <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>
- Monnet, C., Nardi, M., Hols, P., Gulea, M., Corrieu, G., Monnet, V. (2003). Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis by alpha-acetolactate decarboxylase in *Streptococcus thermophilus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 399–405. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01326.x>
- Monteiro M. P., Kohl H. M., Roullet J. B., Gibson K. M., Ochoa-Repáraz J. & Castillo A. R. (2024). Genetically engineered *Lactococcus lactis* strain constitutively expresses GABA-producing genes and produces high levels of GABA. *Letters in Applied Microbiology*, 77(6). <https://doi.org/10.1093/lambio/ovae051>
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N. & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- Ngo, D. H. & Vo, T. S. (2019). An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid. *Molecules*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/molecules24152678>

- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S. & Suzuki, I. (1998). Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 81(6), 1486–1491. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75714-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75714-5)
- Nomura, M., Kobayashi, M., Ohmomo, S. & Okamoto, T. (2000). Inactivation of the glutamate decarboxylase gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2235–2237. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2235-2237.2000>
- Nongonierma, A. B. & FitzGerald, R. J. (2016). Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 26–43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.022>
- Oikonomou, G., Addis, M. F., Chassard, C., Nader-Macias, M. E. F., Grant, I., Delbès, C., Bogni, C. I., Le Loir, Y. & Even, S. (2020). Milk microbiota: what are we exactly talking about?. *Frontiers in Microbiology*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00060>
- Otto, R., Brink, B. ten, Veldkamp, H. & Konings, W. N. (1983). The relation between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiology Letters*, 16(1), 69–74. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00261.x>
- Panda, S. K., Ray, R. C., Mishra, S. S. & Kayitesi, E. (2018). Microbial processing of fruit and vegetable wastes into potential biocommodities: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1311295>
- Pannerchelvan, S., Rios-Solis, L., Wong, F. W. F., Zaidan, U. H., Wasoh, H., Mohamed, M. S., Tan, J. S., Mohamadad, R. & Halim, M. (2023). Strategies for improvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) biosynthesis via lactic acid bacteria (LAB) fermentation. *Food and Function*, 14(9), 3929–3948. <https://doi.org/doi.org/10.1039/D2FO03936B>
- Papadimitriou, K., Alegria, Á., Bron, P. A., De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turroni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E. & Kok, J. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837-890. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00076-15>
- Parente, E., Cogan, T. M. & Powell, I. B. (2017). Starter cultures: General aspects. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter & D. W. Everett (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 201–226). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008-9>
- Parente, E., Ricciardi, A. & Zotta, T. (2020). The microbiota of dairy milk: A review. *International Dairy Journal*, 107, 104714. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104714>

- Park, K. B. & Oh, S. H. (2004). Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum*. *Preventive Nutrition and Food Science*, 9(4), 324-329. <https://doi.org/10.3746/jfn.2004.9.4.324>
- Parte, A. C., Carbasse, J. S., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C. & Göker, M. (2020). List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Penna, A. L. B., Paula, A. T., Casarotti, S. N., Diamantino, V. & Silva, L. (2015). Overview of the functional lactic acid bacteria in fermented milk products. In R.V. Ravishankar & B.A. Jamuna (Eds.), *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods* (pp. 100-154). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b17912>
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: Lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(6), 86. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>
- Pouliot-Mathieu, K., Gardner-Fortier, C., Lemieux, S., St-Gelais, D., Champagne, C. P. & Vuillemond, J. C. (2013). Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria on blood pressure in men. *PharmaNutrition*, 1(4), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2013.06.003>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Quintans, N. G., Blancato, V., Repizo, G., Magni, C. & Lopez, P. (2008). Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. In B. Mayo, P. López & G. Pérez-Martínez (Eds.), *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications* (pp. 65–88). Research Signpost. <http://hdl.handle.net/10261/57507>
- Ramos, I. M. & Poveda, J. M. (2022). Fermented sheep's milk enriched in gamma-amino butyric acid (GABA) by the addition of lactobacilli strains isolated from different food environments. *Food Science and Technology-LWT*, 163(5). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113581>
- Redruello B., Saidi Y., Sampedro L., Ladero V., Del Rio B. & Alvarez M. A. (2021). GABA-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from camel's milk as starters for the production of GABA-enriched cheese. *Foods*. 10(3):633. <https://doi.org/10.3390/foods10030633>

- Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J. R., Martín, M. C., Fernández, M. & Alvarez, M. A. (2013). A fast, reliable, ultra-high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chemistry*, 139(1–4), 1029–1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071>
- Rendueles, C., Duarte, A. C., Escobedo, S., Fernández, L., Rodríguez, A., García, P. & Martínez, B. (2022). Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 368(3). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109611>
- Renes, E., Ladero, V., Tornadijo, M. E. & Fresno, J. M. (2019). Production of sheep milk cheese with high γ-aminobutyric acid and ornithine concentration and with reduced biogenic amines level using autochthonous lactic acid bacteria strains. *Food microbiology*, 78, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.003>
- Renes, E., Linares, D. M., González, L., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E. & Stanton, C. (2017). Production of conjugated linoleic acid and gamma-aminobutyric acid by autochthonous lactic acid bacteria and detection of the genes involved. *Journal of Functional Foods*, 34, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.014>
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M. & Hutkins, R. (2018). Fermented foods as a dietary source of live organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9(9). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Riaz Rajoka, M. S., Wu, Y., Mehwish, H. M., Bansal, M. & Zhao, L. (2020). *Lactobacillus* exopolysaccharides: New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. *Trends in Food Science and Technology*, 103(6), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.003>
- Romero del Castillo Shelly, M. & Mestres Lagarriga, J. (2004). *Productos lácteos: tecnología* (161<sup>a</sup> Ed.). Edicions UPC. <https://doi.org/10.5821/ebook-9788498802610>
- Rossetti, L. & Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 63(2), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.001>
- Rossi, F., Gardini, F., Rizzotti, L., La Gioia, F., Tabanelli, G. & Torriani, S. (2011). Quantitative analysis of histidine decarboxylase gene (*hdca*) transcription and histamine production by *Streptococcus thermophilus* PRI60 under conditions relevant to cheese making. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2817-2822. <https://doi.org/10.1128/AEM.02531-10>

- Salvetti, E., Fondi, M., Fani, R., Torriani, S. & Felis, G. E. (2013). Evolution of lactic acid bacteria in the order lactobacillales as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(5), 291–305. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.009>
- Sánchez, M. M., Delgado, T., Alonso, L. & Mayo, B. (2000). Phenotypic and genetic characterization of a selected set of *Lactococcus lactis* strains isolated from a starter-free farmhouse cheese. *Food microbiology*, 17(4), 449-460. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0340>
- Sanders, J. W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J. R., Venema, G. & Kok, J. (1998). A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Molecular microbiology*, 27(2), 299-310. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00676.x>
- Sarasa, S. B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta, D. R. F. & Angayarkanni, J. (2020). A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): Its production and role in microbes. *Current Microbiology*, 77(4), 534–544. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01839-w>
- Sezgin, E. & Tekin, B. (2023). Molecular evolution and population genetics of glutamate decarboxylase acid resistance pathway in lactic acid bacteria. *Frontiers in Genetics*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1027156>
- Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T. & Matsubayashi, T. (2009). Anti-hypertensive effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-rich chlorella on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double-blind study. *Clinical and Experimental Hypertension*, 31(4), 342–354. <https://doi.org/10.1080/10641960902977908>
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R. & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7283–7290. <https://doi.org/10.1128/AEM.01064-07>
- Somkuti, G. A., Renye, J. A. & Steinberg, D. H. (2012). Molecular analysis of the glutamate decarboxylase locus in *Streptococcus thermophilus* ST110. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(7), 957–963. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1114-0>
- Su, M. S., Schlicht, S. & Gänzle, M. G. (2011). Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 2–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S8>
- Sun, T., Zhao, S., Wang, H., Cai, C., Chen, Y. & Zhang, H. (2009). ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang

- koumiss in China. *European Food Research and Technology*, 228, 607-612. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0969-9>
- Sun, Y., Mehmood, A., Battino, M., Xiao, J. & Chen, X. (2022). Enrichment of gamma-aminobutyric acid in foods: From conventional methods to innovative technologies. *Food Research International*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111801>
- Tapía, M. S., Alzamora, S. M. & Chirife, J. (2020). Effects of water activity ( $a_w$ ) on microbial stability as a hurdle in food preservation. *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*, 323–355. <https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch14>
- Tarrah, A., Treu, L., Giaretta, S., Duarte, V., Corich, V. & Giacomini, A. (2018). Differences in carbohydrates utilization and antibiotic resistance between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products in Italy. *Current microbiology*, 75, 1334-1344. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1528-7>
- Tsukatani, T., Higuchi, T. & Matsumoto, K. (2005). Enzyme-based microtiter plate assay for  $\gamma$ -aminobutyric acid: Application to the screening of  $\gamma$ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 540(2), 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.056>
- Valenzuela, J. A., Flórez, A. B., Vázquez, L., Vasek, O. M. & Mayo, B. (2019). Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by lactic acid bacteria strains isolated from traditional, starter-free dairy products made of raw milk. *Beneficial Microbes*, 10(5), 579–587. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0176>
- Valenzuela, J. A., Vázquez, L., Rodríguez, J., Flórez, A. B., Vasek, O. M. & Mayo, B. (2024). Phenotypic, technological, safety, and genomic profiles of gamma-aminobutyric acid-producing *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from cow's milk. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2328. <https://doi.org/10.3390/ijms25042328>
- van Hylckama Vlieg, J. E., Rademaker, J. L., Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W. J. & Siezen, R. J. (2006). Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.007>
- van Mastrigt, O., Di Stefano, E., Hartono, S., Abbe, T. & Smid, E. J. (2018). Large plasmidome of dairy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* FM03P encodes technological functions and appears highly unstable. *BMC Genomics*, 19(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5005-2>
- Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N. & Šikić, M. (2017). Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Research*, 27(5), 737–746. <https://doi.org/10.1101/gr.214270.116>

- Villamil, R. A., Robelto, G. E., Mendoza, M. C., Guzmán, M. P., Cortés, L. Y., Méndez, C. A. & Giha, V. (2020). Development and health implications of functional dairy food products: A review. *Revista Chilena de Nutrición*, 47(6), 1018–1028. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182020000601018>
- Villegas, J. M., Brown, L., Savoy de Giori, G. & Hebert, E. M. (2016). Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT*, 67, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.027>
- Vos, P., van Asseldonk, M., van Jeveren, F., Siezen, R., Simons, G. & de Vos, W.M. (1989). A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *Journal of Bacteriology*, 171, 2795–2802. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2795-2802.1989>
- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K. & Earl, A. M. (2014). Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
- Walker, C. & Thomas, M. G. (2019). The evolution of lactose digestion. In M. Paques & C. Lindner (Eds.) *Lactose: Evolutionary Role, Health Effects, and Applications*. Elsevier (pp. 1-48). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811720-0.00001-5>
- Wang, H., Baldwin, K. A., O'Sullivan, D. J. & McKay, L. L. (2000). Identification of a gene cluster encoding Krebs cycle oxidative enzymes linked to the pyruvate carboxylase gene in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 1,2. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1912–1918. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75066-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75066-1)
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y. & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(5), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Warner, J. B. & Lolkema, J. S. (2003). CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 475-490. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.475-490.2003>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>

- Wu, Q. & Shah, N. P. (2017). High  $\gamma$ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactobacillus brevis* as a functional dairy starter. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(7), 3661–3672. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147418>
- Xiong, Z. Q., Fan, Y. Z., Song, X., Xia, Y. J., Zhang, H. & Ai, L. Z. (2020). Genome-wide identification of new reference genes for reverse-transcription quantitative PCR in *Streptococcus thermophilus* based on RNA-sequencing analysis. *Journal of Dairy Science*, 103(11), 10001–10005. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18672>
- Yamauchi, R., Maguin, E., Horiuchi, H., Hosokawa, M. & Sasaki, Y. (2019). The critical role of urease in yogurt fermentation with various combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 1033–1043. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15192>
- Yogeswara, I. B. A., Maneerat, S. & Haltrich, D. (2020). Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria—A key enzyme in GABA synthesis. *Microorganisms*, 8(12), 1923. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121923>
- Yoon, S. H., Ha, S. min, Lim, J., Kwon, S. & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(10), 1281–1286. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>
- Yoon, S., Byun, J. I. & Shin, W. C. (2022). Efficacy and safety of low-dose gamma-aminobutyric acid from unpolished rice germ as a health functional food for promoting sleep: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Neurology*, 18(4), 478–480. <https://doi.org/10.3988/jcn.2022.18.4.478>
- Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Dyachkova, M. S., Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Averina, O. V., Orlova, V. S. & Danilenko, V. N. (2016). GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe*, 42, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.011>
- Zaidi, A. H., Bakkes, P. J., Lubelski, J., Agustiandari, H., Kuipers, O. P. & Driessen, A. J. M. (2008). The ABC-type multidrug resistance transporter LmrCD is responsible for an extrusion-based mechanism of bile acid resistance in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 190(22), 7357–7366. <https://doi.org/10.1128/JB.00485-08>
- Zhang, Y., Zhu, M., Lu, W., Zhang, C., Chen, D., Shah, N. P. & Xiao, C. (2023). Optimizing *Levilactobacillus brevis* NPS-QW 145 fermentation for gamma-aminobutyric acid (GABA) production in soybean sprout yogurt-like product. *Foods*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/foods12050977>

- Zhang, Z. G., Ye, Z. Q., Yu, L. & Shi, P. (2011). Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: An update. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-1>
- Zhao, R., Chen, Z., Liang, J., Dou, J., Guo, F., Xu, Z. & Wang, T. (2023). Advances in genetic tools and their application in *Streptococcus thermophilus*. *Foods*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/foods12163119>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G. & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhu, F., Hu, S. & Mei, L. (2024). Production and quality evaluation of a novel γ-aminobutyric acid-enriched yogurt. *Frontiers in Nutrition*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1404743>
- Ziadi, M., Wathelet, J. P., Marlier, M., Hamdi, M. & Thonart, P. (2008). Analysis of volatile compounds produced by 2 strains of *Lactococcus lactis* isolated from leben (Tunisian fermented milk) using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Journal of Food Science*, 73(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00846.x>
- Zotta, T., Faraone, I., Giavalisco, M., Parente, E., Lela, L., Storti, L. V. & Ricciardi, A. (2022). The production of γ-aminobutyric acid from free and immobilized cells of *Levilactobacillus brevis* cultivated in anaerobic and aerobic conditions. *Microorganisms*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112184>



# **ANEXOS**



## 8. ANEXOS

### ANEXO I. Microorganismos y condiciones de cultivo.

**Tabla 1.** Origen de las cepas/aislados de bacterias lácticas (BAL) analizadas para la producción de ácido γ-aminobutírico.

| Especies   | Nº de cepas/aislados | Origen                            | Medio de aislamiento y condiciones de cultivo |
|--|----------------------|-----------------------------------|---|
| <i>Enterococcus faecium</i>                                  | 2                    | Queso Cabrales <sup>1</sup>       | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i><br>subsp. <i>bulgaricus</i> | 2                    | Yogur iraní                       | MRS/37°C/anaerobiosis                         |
| <i>Lb. delbrueckii</i> subsp.<br><i>bulgaricus</i>           | 3                    | LFN <sup>2</sup>                  | MRS/37°C/aerobiosis                           |
| <i>Lb. delbrueckii</i> subsp.<br><i>bulgaricus</i>           | 10                   | Kéfir brasileño <sup>3</sup>      | MRS/37°C/anaerobiosis                         |
| <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>                  | 4                    | Yogur iraní                       | MRS/37°C/anaerobiosis                         |
| <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>                  | 1                    | LFN <sup>2</sup>                  | MRS/37°C/aerobiosis                           |
| <i>Lactobacillus helveticus</i>                              | 3                    | Yogur iraní                       | MRS/37°C/anaerobiosis                         |
| <i>Lb. helveticus</i>  | 1                    | Leche                             | MRS/37°C/aerobiosis                           |
| <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>                         | 3                    | Kéfir brasileño                   | MRS/37°C/anaerobiosis                         |
| <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>                          | 5                    | Queso Cabrales                    | MRS/37°C/aerobiosis                           |
| <i>Lcb. paracasei</i>  | 4                    | Casín <sup>1</sup>                | MRS/37°C/aerobiosis                           |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>                         | 8                    | Queso Cabrales                    | MRS/32°C/aerobiosis                           |
| <i>Lpb. plantarum</i>  | 5                    | Queso Peñamellera <sup>1</sup>    | MRS/32°C/aerobiosis                           |
| <i>Lpb. plantarum</i>  | 5                    | Queso Casín                       | MRS/32°C/aerobiosis                           |
| <i>Lpb. plantarum</i>  | 1                    | Quesos artesanales argentinos     | MRS/32°C/aerobiosis                           |
| <i>Lactococcus lactis</i>                                    | 24                   | Leche cruda Asturias <sup>5</sup> | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>               | 30                   | Queso Cabrales                    | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>                        | 24                   | Queso Peñamellera                 | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>                        | 35                   | Queso Casín                       | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>                        | 29                   | Queso Genestoso <sup>1</sup>      | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>                        | 1                    | LFN <sup>2</sup>                  | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>                        | 1                    | Kéfir brasileño                   | MRS/37°C/anaerobiosis                         |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>                        | 5                    | Quesos artesanales argentinos     | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>                      | 5                    | Queso Cabrales                    | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>                      | 7                    | Queso Peñamellera                 | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>                      | 12                   | Queso Genestoso                   | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>                      | 1                    | LFN <sup>2</sup>                  | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>                 | 1                    | Quesos artesanales argentinos     | GM17/32°C/aerobiosis                          |
| <i>Leuconostoc citreum</i>                                   | 4                    | Queso Casín                       | Elliker/32°C/aerobiosis <sup>4</sup>          |
| <i>Ln. citreum</i>   | 3                    | Queso Genestoso                   | Elliker/32°C/aerobiosis                       |
| <i>Leuconostoc lactis</i>                                    | 1                    | Queso Casín                       | Elliker/32°C/aerobiosis                       |
| <i>Ln. lactis</i>  | 1                    | Queso Genestoso                   | Elliker/32°C/aerobiosis                       |

|   |    |                                   |                         |
|---|----|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i>                      | 4  | Queso Cabrales                    | Elliker/32°C/aerobiosis |
| subsp. <i>mesenteroides</i>                           |    |                                   |                         |
| <i>Ln. mesenteroides</i> subsp.<br><i>cremoris</i>    | 1  | Queso Peñamellera                 | Elliker/32°C/aerobiosis |
| <i>Ln. mesenteroides</i> subsp.<br><i>dextranicum</i> | 1  | Quesos artesanales argentinos     | Elliker/32°C/aerobiosis |
| <i>Streptococcus thermophilus</i>                     | 28 | Yogur iraní                       | LM17/37°C/anaerobiosis  |
| <i>S. thermophilus</i>                                | 24 | Leche cruda Asturias <sup>5</sup> | LM17/42°C/anaerobiosis  |
| <i>S. thermophilus</i>                                | 10 | LFN <sup>2</sup>                  | LM17/37°C/anaerobiosis  |
| <i>S. thermophilus</i>                                | 1  | Queso Genestoso                   | LM17/37°C/anaerobiosis  |

<sup>1</sup> Los quesos Cabrales, Peñamellera, Casín y Genestoso son quesos tradicionales españoles, de leche cruda y sin fermentos.

<sup>2</sup> LFN= leches fermentadas naturales; las BAL termófilas se habían aislado después de la pasteurización y acidificación durante la noche, mientras que las BAL mesófilas se habían aislado de una leche fermentada tradicional.

<sup>3</sup> Aislamiento de cepas de BAL de kéfir brasileño de tres granos de kéfir diferentes.

<sup>4</sup> Para el aislamiento de *Leuconostoc*, las placas de Elliker se habían suplementado con vancomicina (100 µg/mL).

<sup>5</sup> Las leches crudas provienen de diferentes zonas de oriente, centro, occidente y sur occidente de Asturias.

**ANEXO II.** Composición de los medios de cultivo y las soluciones empleadas.**Tabla 1.** MRS–De Man, Rogosa y Sharpe (Oxoid, Thermo-Fisher, Basingstoke, Reino Unido).

| MRS                  |  |         |
|----------------------|--|---------|
|                      | Constituyentes                         | Por L   |
| 1                    | Peptona                                | 10,00 g |
| 2                    | Extracto de carne ('Lab-Lemco')        | 8,00 g  |
| 3                    | Extracto de levadura                   | 4,00 g  |
| 4                    | Glucosa                                | 20,00 g |
| 5                    | Mono oleato de sorbitán                | 1,00 mL |
| 6                    | Fosfato acido de potasio               | 2,00 g  |
| 7                    | Acetato de sodio 3H <sub>2</sub> O     | 5,00 g  |
| 8                    | Citrato de triamonio                   | 2,00 g  |
| 9                    | Sulfato de magnesio 7H <sub>2</sub> O  | 0,20 g  |
| 10                   | Sulfato de manganeso 4H <sub>2</sub> O | 0,05 g  |
| 11                   | Agar                                   | 10,00 g |
| pH: 6,2 ± 0,2 a 25°C |  |         |

**Tabla 2.** Elliker (Biokar Diagnostics, Francia).

| Elliker              |                      |         |
|----------------------|----------------------|---------|
|                      | Constituyentes       | Por L   |
| 1                    | Triptona             | 20,00 g |
| 2                    | Extracto de levadura | 5,00 g  |
| 3                    | Gelatina             | 2,50 g  |
| 4                    | Lactosa              | 5,00 g  |
| 5                    | Sacarosa             | 5,00 g  |
| 6                    | Glucosa              | 5,00 g  |
| 7                    | Acetato de sodio     | 1,50 g  |
| 8                    | Cloruro de sodio     | 4,00 g  |
| 9                    | Ácido ascorbico      | 0,50 g  |
| pH: 6,8 ± 0,2 a 25°C |                      |         |

**Tabla 3.** M17 (Formedium™, Hunstanton, United Kingdom).

| Medio M17 lactosa/glucosa |                             |         |
|---------------------------|-----------------------------|---------|
|                           | Constituyentes              | Por L   |
| 1                         | Triptona                    | 2,50 g  |
| 2                         | Digerido pépsínico de carne | 2,50 g  |
| 3                         | Digerido papaínico de soja  | 5,00 g  |
| 4                         | Extracto de levadura        | 2,50 g  |
| 5                         | Extracto de carne           | 5,00 g  |
| 6                         | Lactosa/glucosa             | 10,00 g |
| 7                         | Glicerofosfato sódico       | 19,00 g |
| 8                         | Sulfato de Magnesio         | 0,25 g  |
| 9                         | Ácido ascórbico             | 0,50 g  |

pH: 7,1 ± 0,1 a 25°C

Composición del medio de cultivo M17 (Formedium™, Hunstanton United Kingdom), se agrega 36,15 g en 1L agua destilada.

**Tabla 4.** Medio mínimo químicamente definido CDM (Otto et al., 1983).

| Medio químicamente definido CDM |  |        |
|---------------------------------|--|--------|
|                                 | Constituyentes   | Por L  |
| 1                               | Lactosa  | 2,50 g |
| 2                               | Fosfato acido de potasio K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 2,50 g |
| 3                               | Fosfato diacido de potasio KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 3,00 g |
| 4                               | Citrato de amonio  | 0,60 g |
| 5                               | Acetato de sodio   | 1,00 g |
| 6                               | Cisteína-HCl   | 0,25 g |
| 7                               | Hidrolizado de caseína libre de sal y libre de vitaminas   | 5,00 g |
| 8                               | Solución de vitaminas                                      | 10 mL  |
| 9                               | Solución de metales  | 10 mL  |

pH: 6,7 ± 0,2 a 25°C

Esterilizar a través de un filtro de membrana de nitrato de celulosa (0,15 µm).

| Solución de vitaminas |                     |        |
|-----------------------|---------------------|--------|
|                       | Constituyentes      | Por L  |
| 1                     | Piridoxina-HCl      | 200 mg |
| 2                     | Ácido nicotínico    | 100 mg |
| 3                     | Tiamina-HCl         | 100 mg |
| 4                     | Riboflavina         | 100 mg |
| 5                     | Ca-(D+)-pantotenato | 100 mg |
| 6                     | Na-p-aminobenzoato  | 1,00 g |

|    |                       |        |
|----|-----------------------|--------|
| 7  | D-biotina             | 1,00 g |
| 8  | Ácido fólico          | 100 mg |
| 9  | Vitamina B12          | 100 mg |
| 10 | Ácido orótico         | 500 mg |
| 11 | 2-desoxitimidina      | 500 mg |
| 12 | Inosina               | 500 mg |
| 13 | DL-6,8-ácido tióctico | 250 mg |
| 14 | Piridoxamina-HCl      | 500 mg |

pH: 7 ± 0,2 a 25°C

| <b>Solución de metales</b> |  |         |
|----------------------------|--|---------|
|                            | Constituyentes   | Por L   |
| 1                          | Cloruro de magnesio MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O     | 20,00 g |
| 2                          | Cloruro de calcio CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O       | 5,00 g  |
| 3                          | Cloruro de hierro (II) FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O  | 0,50 g  |
| 4                          | Sulfato de zinc ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O         | 0,50 g  |
| 5                          | Cloruro de cobalto (II) CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0,25 g  |

| <b>Solución de bases de ácido nucleico contenida por 10 mL de 0,1 N NaOH</b> |                |       |
|--|----------------|-------|
|  | Constituyentes |       |
| 1  | Adenina        | 10 mg |
| 2  | Uracilo        | 10 mg |
| 3  | Xantina        | 10 mg |
| 4  | Guanina        | 10 mg |

**Tabla 5.** Mueller-Hinton (Merck, Darmstadt, Alemania).

| <b>Mueller-Hinton</b> |                                     |         |
|-----------------------|-------------------------------------|---------|
|                       | Constituyentes                      | Por L   |
| 1                     | Sólidos de infusión de carne de res | 2,00 g  |
| 2                     | Almidón                             | 1,50 g  |
| 3                     | Hidrolizado de caseína              | 17,50 g |

pH: 7,4 ± 0,2 a 25°C

**Tabla 6.** Agar para recuento en placa PCMA - *Plate Count Skimmed Milk Agar* (Merck).

| PCMA                 |   |         |
|----------------------|---|---------|
|                      | Constituyentes                              | Por L   |
| 1                    | Triptona (Digestión enzimática de caseína)  | 5,00 g  |
| 2                    | Extracto de levadura                        | 2,50 g  |
| 3                    | Glucosa                                     | 1,00 g  |
| 4                    | Leche en polvo descremada (sin inhibidores) | 1,00 g  |
| 5                    | Agar  | 15,00 g |
| pH: 7,0 ± 0,2 a 25°C |   |         |

**Tabla 7.** Medio de fermentación para fecales según (Fooks & Gibson, 2003).

| Medio de fermentación fecal |   |        |
|-----------------------------|---|--------|
|                             | Constituyentes  | Por L  |
| 1                           | Agua peptonada  | 2,0 mL |
| 2                           | Extracto de levadura  | 2,0 g  |
| 3                           | Cloruro de sodio (NaCl)   | 0,1 g  |
| 4                           | Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )            | 0,04 g |
| 5                           | Fosfato monobásico de potasio KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>             | 0,04 g |
| 6                           | Cloruro de calcio pentahidratado (CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)   | 0,01 g |
| 7                           | Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) | 0,01 g |
| 8                           | Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )                                | 2,0 g  |
| 9                           | Tween 80  | 2,0 mL |
| 10                          | Hemina (disuelta en tres gotas de NaOH 1 M)                               | 0,05 g |
| 11                          | Vitamina K1   | 10 µL  |
| 12                          | Cisteína-HCl  | 0,5 g  |
| 13                          | Sales biliares  | 0,5 g  |
| 14                          | Glutamato monosódico  | 30 g   |

**Tabla 8.** Solución salina NaCl 0,9 % (p/v).

| Solución salina |                         |       |
|-----------------|-------------------------|-------|
|                 | Constituyentes          | Por L |
| 1               | Cloruro de sodio (NaCl) | 9,0 g |

**Tabla 9.** Solución Ringer (Merck).

| Ringer |                                     |        |
|--------|-------------------------------------|--------|
|        | Constituyentes                      | Por L  |
| 1      | Cloruro de calcio 6H <sub>2</sub> O | 0,12 g |
| 2      | Cloruro de potasio                  | 0,10 g |
| 3      | Bicarbonato de sodio                | 0,05 g |
| 4      | Cloruro de sodio                    | 2,25 g |

**Tabla 10.** Diluyente de máxima recuperación MRD - *maximun recovery diluent* (Merck).

| MRD                        |                                    |       |
|----------------------------|------------------------------------|-------|
|                            | Constituyentes                     | Por L |
| 1                          | Digerido péptico de tejido animal. | 1,0 g |
| 2                          | Cloruro de sodio                   | 8,5 g |
| <b>pH 7,0 ± 0,2 a 25°C</b> |                                    |       |

**Tabla 11.** Tampón fosfato salino PBS - *phosphate buffered saline* (Oxoid).

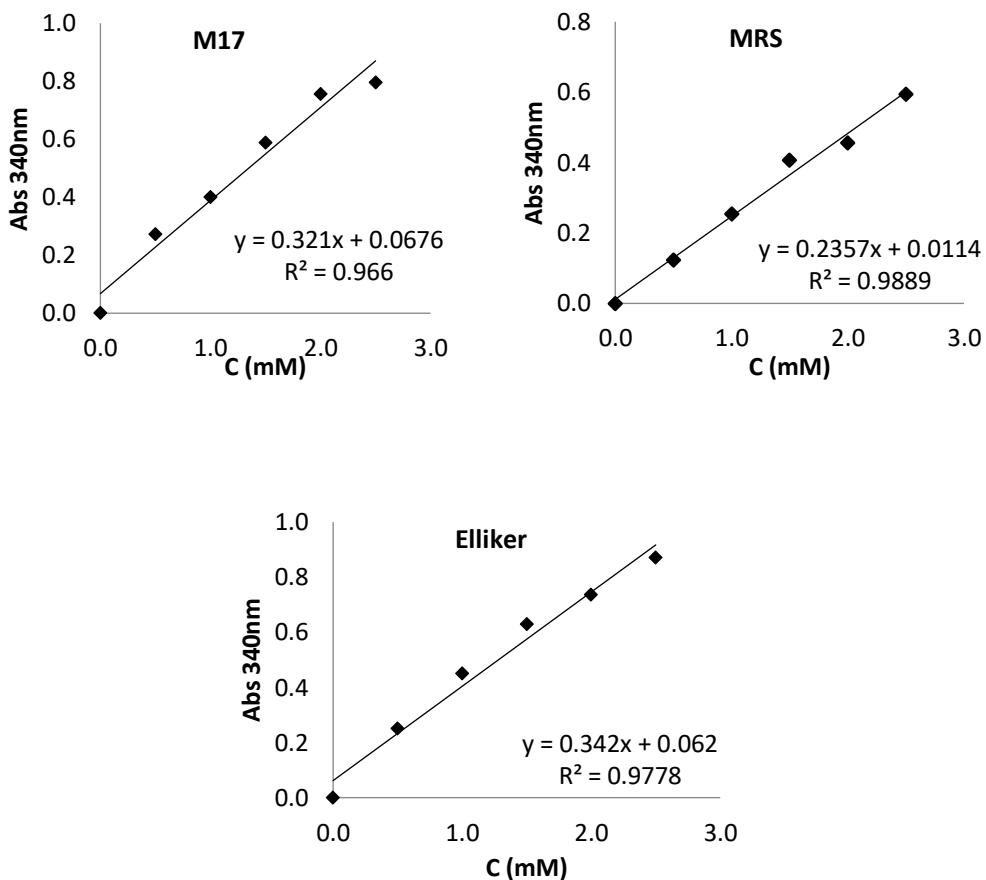
| Tampón fosfato salino PBS  |   |        |
|----------------------------|---|--------|
|                            | Constituyentes  | Por L  |
| 1                          | Cloruro de sodio (NaCl)                                       | 8,0 g  |
| 2                          | Cloruro de potasio (KCl)                                      | 0,2 g  |
| 3                          | Fosfato acido de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )   | 1,15 g |
| 4                          | Fosfato diacido de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | 0,2 g  |
| <b>pH 7,3 ± 0,2 a 25°C</b> |   |        |



**ANEXO III.** Datos de concentración de GABA producidas por los aislados y cepas en estudio.

**Tabla 1.** Absorbancia  $\text{Abs}_{340\text{nm}}$  obtenida con diferentes concentraciones de GABA en medio de cultivo M17, MRS y Elliker para la construcción de curvas de calibrado. GM17 y LM17 presentan la misma curva de calibrado, ya que la glucosa y la lactosa no presentan absorbancia en el espectro UV-Visible.

| M17       |           | MRS       |           | Elliker   |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| GABA (mM) | Abs 340nm | GABA (mM) | Abs 340nm | GABA (mM) | Abs 340nm |
| 0,0       | 0,000     | 0,0       | 0,000     | 0,0       | 0,000     |
| 0,5       | 0,273     | 0,5       | 0,124     | 0,5       | 0,251     |
| 1,0       | 0,400     | 1,0       | 0,254     | 1,0       | 0,450     |
| 1,5       | 0,588     | 1,5       | 0,407     | 1,5       | 0,630     |
| 2,0       | 0,756     | 2,0       | 0,456     | 2,0       | 0,736     |
| 2,5       | 0,796     | 2,5       | 0,595     | 2,5       | 0,870     |
| 3,0       | 0,841     | 3,0       | 0,545     | 3,0       | 0,886     |



**Figura 1.** Curvas de calibración de GABA en medio de cultivo M17, MRS y Elliker.

**Tabla 2.** Producción de GABA (mM) en medio de cultivo medido por el método enzimático de GABasa.

|           | Especie                               | cepa | Producción de GABA (mM) |
|-----------|---------------------------------------|------|-------------------------|
| <b>1</b>  | <i>Ln. mesenteroides</i>              | 14c  | 0,00                    |
| <b>2</b>  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 35c  | 0,00                    |
| <b>3</b>  | <i>Lpb. plantarum</i>                 | 77   | 0,00                    |
| <b>4</b>  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 138  | 0,00                    |
| <b>5</b>  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 140  | 0,00                    |
| <b>6</b>  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 155  | 0,00                    |
| <b>7</b>  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 157  | 0,00                    |
| <b>8</b>  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 159  | 0,12                    |
| <b>9</b>  | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 163  | 0,00                    |
| <b>10</b> | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 164  | 0,00                    |
| <b>11</b> | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 166  | 0,12                    |

|    |                                       |                |      |
|----|---------------------------------------|----------------|------|
| 12 | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 199            | 0,00 |
| 13 | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 207            | 0,00 |
| 14 | <i>L. lactis</i>                      | 1471           | 0,00 |
| 15 | <i>L. lactis</i>                      | 1858           | 0,00 |
| 16 | <i>L. lactis</i>                      | 2024           | 0,00 |
| 17 | <i>Lpb. plantarum</i>                 | 2949           | 0,00 |
| 18 | <i>L. lactis</i>                      | 2954           | 0,00 |
| 19 | <i>L. lactis</i>                      | 2967           | 0,00 |
| 20 | <i>L. lactis</i>                      | 3068           | 0,00 |
| 21 | <i>L. lactis</i>                      | 3082           | 0,00 |
| 22 | <i>L. lactis</i>                      | 3197           | 0,00 |
| 23 | <i>L. lactis</i>                      | 3203           | 0,00 |
| 24 | <i>L. lactis</i>                      | 3454           | 0,00 |
| 25 | <i>Lcb. casei</i>                     | 3564           | 0,00 |
| 26 | <i>L. lactis</i>                      | 3593           | 0,00 |
| 27 | <i>L. lactis</i>                      | 5226           | 0,00 |
| 28 | <i>L. lactis</i>                      | 5400           | 0,00 |
| 29 | <i>Enterococcus faecalis</i>          | BAGY           | 0,00 |
| 30 | <i>Lb. parabuchneri</i>               | 2ES-1          | 0,00 |
| 31 | <i>L. lactis</i>                      | 1AA6 L LAC 1   | 1,43 |
| 32 | <i>L. lactis</i>                      | 1AA10 L LAC 2  | 1,03 |
| 33 | <i>L. lactis</i>                      | 1AA17 L LAC 3  | 0,52 |
| 34 | <i>L. lactis</i>                      | 1AA29 L LAC 4  | 0,08 |
| 35 | <i>L. lactis</i>                      | 2BA1 L LAC 5   | 0,00 |
| 36 | <i>L. lactis</i>                      | 2BA20 L LAC 6  | 0,66 |
| 37 | <i>L. lactis</i>                      | 2BA40 L LAC 7  | 0,49 |
| 38 | <i>L. lactis</i>                      | 3AA12 L LAC 8  | 0,25 |
| 39 | <i>L. lactis</i>                      | 3AA15 LLAC 9   | 0,77 |
| 40 | <i>L. lactis</i>                      | 3AA2E L LAC 10 | 0,62 |
| 41 | <i>L. lactis</i>                      | 4AA2 L LAC 11  | 0,35 |
| 42 | <i>L. lactis</i>                      | 2BB7 L LAC 12  | 0,11 |
| 43 | <i>L. lactis</i>                      | 2BB9 L LAC 13  | 2,14 |
| 44 | <i>L. lactis</i>                      | LC144 L LAC 14 | 0,79 |
| 45 | <i>L. lactis</i>                      | 4AA10 L LAC 15 | 1,80 |

|    |                  |                 |      |
|----|------------------|-----------------|------|
| 46 | <i>L. lactis</i> | T129 L LAC 16   | 0,04 |
| 47 | <i>L. lactis</i> | T226 L LAC 17   | 0,43 |
| 48 | <i>L. lactis</i> | T2 43 L LAC 18  | 0,00 |
| 49 | <i>L. lactis</i> | Q2 L LAC 19     | 0,36 |
| 50 | <i>L. lactis</i> | Q6 L LAC 20     | 0,14 |
| 51 | <i>L. lactis</i> | Q1-8 L LAC 21   | 0,55 |
| 52 | <i>L. lactis</i> | CAS 2 L LAC 22  | 0,00 |
| 53 | <i>L. lactis</i> | CAS 3 L LAC 23  | 0,15 |
| 54 | <i>L. lactis</i> | GE-7 L LAC 24   | 0,75 |
| 55 | <i>L. lactis</i> | GE37 L LAC 25   | 0,61 |
| 56 | <i>L. lactis</i> | GE 42 L LAC 26  | 0,62 |
| 57 | <i>L. lactis</i> | GE2 14 L LAC 27 | 0,56 |
| 58 | <i>L. lactis</i> | GE220 L LAC 28  | 0,34 |
| 59 | <i>L. lactis</i> | 2BA36 L LAC 29  | 0,61 |
| 60 | <i>L. lactis</i> | 1AA12 L LAC 30  | 1,31 |
| 61 | <i>L. lactis</i> | 2A83 L LAC 31   | 0,38 |
| 62 | <i>L. lactis</i> | 2A88 L LAC 32   | 0,35 |
| 63 | <i>L. lactis</i> | 1A6 L LAC 33    | 0,00 |
| 64 | <i>L. lactis</i> | 1A8 L LAC 34    | 0,00 |
| 65 | <i>L. lactis</i> | 1A19 L LAC 35   | 1,47 |
| 66 | <i>L. lactis</i> | 1A26 L LAC 36   | 0,26 |
| 67 | <i>L. lactis</i> | IA36 L LAC 37   | 0,00 |
| 68 | <i>L. lactis</i> | IA37 L LAC 38   | 0,60 |
| 69 | <i>L. lactis</i> | IA38 L LAC 39   | 0,00 |
| 70 | <i>L. lactis</i> | LC327T L LAC 39 | 2,39 |
| 71 | <i>L. lactis</i> | LC531 L LAC 41  | 1,01 |
| 72 | <i>L. lactis</i> | LC69A L LAC 42  | 1,16 |
| 73 | <i>L. lactis</i> | LC83A L LAC 43  | 1,24 |
| 74 | <i>L. lactis</i> | LC101 L LAC 44  | 1,17 |
| 75 | <i>L. lactis</i> | L12 L LAC 45    | 0,52 |
| 76 | <i>L. lactis</i> | IAA48 L LAC 46  | 1,05 |
| 77 | <i>L. lactis</i> | IAA59 L LAC 47  | 1,62 |
| 78 | <i>L. lactis</i> | 3AA11 L LAC 48  | 0,51 |
| 79 | <i>L. lactis</i> | 3AA23 L LAC 49  | 0,07 |

|     |                       |                     |      |
|-----|-----------------------|---------------------|------|
| 80  | <i>L. lactis</i>      | 3AA 27 L LAC 50     | 0,00 |
| 81  | <i>L. lactis</i>      | 3AA7 L LAC 51       | 0,00 |
| 82  | <i>L. lactis</i>      | 3AA9 L LAC 52       | 0,00 |
| 83  | <i>L. lactis</i>      | 4AA28 L LAC 53      | 0,40 |
| 84  | <i>L. lactis</i>      | IAR8 L LAC 54       | 0,39 |
| 85  | <i>L. lactis</i>      | IA16 L LAC 55       | 0,76 |
| 86  | <i>L. lactis</i>      | IAA35 L LAC 56      | 0,04 |
| 87  | <i>L. lactis</i>      | L 74 L LAC 57       | 0,40 |
| 88  | <i>L. lactis</i>      | L 35 L LAC 58       | 0,54 |
| 89  | <i>L. lactis</i>      | LC171ALTI L LAC 60  | 0,24 |
| 90  | <i>L. lactis</i>      | 2A27 L LAC 61       | 0,48 |
| 91  | <i>L. lactis</i>      | L39 L LAC 62        | 0,09 |
| 92  | <i>L. lactis</i>      | L39 CABRAL L LAC 63 | 0,15 |
| 93  | <i>L. lactis</i>      | L30 CABRAL LLAC 64  | 0,53 |
| 94  | <i>L. lactis</i>      | 2AS LLAC 65         | 0,64 |
| 95  | <i>L. lactis</i>      | LC2A LLAC 66        | 1,21 |
| 96  | <i>L. lactis</i>      | IAA8 L LAC 67       | 0,00 |
| 97  | <i>L. lactis</i>      | LCI 487 L LAC 67    | 0,03 |
| 98  | <i>L. lactis</i>      | 171A (B) L LAC 68   | 0,00 |
| 99  | <i>L. lactis</i>      | L30 L LAC 69        | 0,55 |
| 100 | <i>L. lactis</i>      | L42 L LAC 70        | 0,29 |
| 101 | <i>L. lactis</i>      | LCIIA LLAC 71       | 0,00 |
| 102 | <i>L. lactis</i>      | LC1C L LAC 72       | 0,00 |
| 103 | <i>L. lactis</i>      | LAA 23 LLAC 72      | 0,28 |
| 104 | <i>L. lactis</i>      | Lc9c L LAC 73       | 1,14 |
| 105 | <i>L. lactis</i>      | L17 L LAC 74        | 0,25 |
| 106 | <i>L. lactis</i>      | IAA31 L LAC 75      | 1,30 |
| 107 | <i>L. lactis</i>      | L12 L LAC 76        | 0,06 |
| 108 | <i>L. lactis</i>      | IAA22 L LAC 77      | 0,07 |
| 109 | <i>Lcb. paracasei</i> | CA2AS L PAR 1       | 0,10 |
| 110 | <i>Lcb. paracasei</i> | 4AB24 L PAR 2       | 0,00 |
| 111 | <i>Lcb. paracasei</i> | V18 L PAR 3         | 0,00 |
| 112 | <i>Lcb. paracasei</i> | V119 L PAR 4        | 0,00 |
| 113 | <i>Lcb. paracasei</i> | VII2A L PAR 5       | 0,00 |

|            |                          |                |      |
|------------|--------------------------|----------------|------|
| <b>114</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | V12021 L PAR 6 | 0,00 |
| <b>115</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | CA2A9 L PAR 7  | 0,00 |
| <b>116</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | 3AB20 L PAR 8  | 0,00 |
| <b>117</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | 6A102 L PAR 9  | 0,00 |
| <b>118</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | CA2PI L PAR 10 | 0,27 |
| <b>119</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | 4AB10 L PAR 11 | 0,03 |
| <b>120</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | 2BB33 L PAR 12 | 0,00 |
| <b>121</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | 2BB31 L PAR 13 | 0,15 |
| <b>122</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | CS82 L PAR 14  | 0,00 |
| <b>123</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | 4AB16 L PAR 15 | 0,00 |
| <b>124</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | 2BB36 L PAR 16 | 0,00 |
| <b>125</b> | <i>Lcb. paracasei</i>    | 2BB24 L PAR 17 | 2,37 |
| <b>126</b> | <i>Lcb. plantarum</i>    | 2B47I L PLA 1  | 0,00 |
| <b>127</b> | <i>Ln. mesenteroides</i> | 2BB34 L MES 1  | 0,00 |
| <b>128</b> | <i>Ln. mesenteroides</i> | 3AC12 L MES 2  | 0,00 |
| <b>129</b> | <i>Ln. mesenteroides</i> | 3AC2 L MES 3   | 0,58 |
| <b>130</b> | <i>Ln. mesenteroides</i> | 3AC16 L MES 4  | 0,45 |
| <b>131</b> | <i>Ln. mesenteroides</i> | BC24 L MES 5   | 0,14 |
| <b>132</b> | <i>Ln. mesenteroides</i> | 4AB8 L MES 6   | 0,10 |
| <b>133</b> | <i>Ln. lactis</i>        | 4AR2 LEU LAC 1 | 1,13 |
| <b>134</b> | <i>Ln. citreum</i>       | 4AC4 L CIT 1   | 0,00 |
| <b>135</b> | <i>Ln. citreum</i>       | 2BB17 L CIT 2  | 0,00 |
| <b>136</b> | <i>Ln. citreum</i>       | 1AC10 L CIT 3  | 0,00 |
| <b>137</b> | <i>Ln. citreum</i>       | 2BC8 L CIT 4   | 0,00 |
| <b>138</b> | <i>Ln. citreum</i>       | 4AC18 L CIT 5  | 0,00 |
| <b>139</b> | <i>Ln. citreum</i>       | 1AC1 L CIT 6   | 0,19 |
| <b>140</b> | <i>L. lactis</i>         | 1A1a           | 0,00 |
| <b>141</b> | <i>L. lactis</i>         | 1A2a           | 0,10 |
| <b>142</b> | <i>L. lactis</i>         | 1A4a           | 0,00 |
| <b>143</b> | <i>L. lactis</i>         | 1A6a           | 0,00 |
| <b>144</b> | <i>L. lactis</i>         | 1B1a           | 0,03 |
| <b>145</b> | <i>L. lactis</i>         | 1B3ac          | 0,00 |
| <b>146</b> | <i>L. lactis</i>         | 1B5a           | 0,00 |
| <b>147</b> | <i>L. lactis</i>         | 1B8d           | 0,00 |

|            |                  |      |      |
|------------|------------------|------|------|
| <b>148</b> | <i>L. lactis</i> | 2A1a | 0,46 |
| <b>149</b> | <i>L. lactis</i> | 2A2a | 0,00 |
| <b>150</b> | <i>L. lactis</i> | 2A3a | 0,00 |
| <b>151</b> | <i>L. lactis</i> | 2A6a | 0,00 |
| <b>152</b> | <i>L. lactis</i> | 2B1a | 0,31 |
| <b>153</b> | <i>L. lactis</i> | 2B1c | 0,22 |
| <b>154</b> | <i>L. lactis</i> | 2B2a | 0,00 |
| <b>155</b> | <i>L. lactis</i> | 2B6a | 0,00 |
| <b>156</b> | <i>L. lactis</i> | 2B7a | 0,00 |
| <b>157</b> | <i>L. lactis</i> | 2B3b | 0,00 |
| <b>158</b> | <i>L. lactis</i> | 1C1a | 0,28 |
| <b>159</b> | <i>L. lactis</i> | 1C3b | 0,00 |
| <b>160</b> | <i>L. lactis</i> | 1C4b | 0,00 |
| <b>161</b> | <i>L. lactis</i> | 1C7a | 0,49 |
| <b>162</b> | <i>L. lactis</i> | 2C1a | 0,93 |
| <b>163</b> | <i>L. lactis</i> | 2C2a | 0,38 |
| <b>164</b> | <i>L. lactis</i> | 2C3a | 0,00 |
| <b>165</b> | <i>L. lactis</i> | 2C4a | 0,09 |
| <b>166</b> | <i>L. lactis</i> | 7C1a | 0,77 |
| <b>167</b> | <i>L. lactis</i> | 7C6c | 0,00 |
| <b>168</b> | <i>L. lactis</i> | 7D7a | 0,00 |
| <b>169</b> | <i>L. lactis</i> | 1F2a | 0,26 |
| <b>170</b> | <i>L. lactis</i> | 1F3a | 0,36 |
| <b>171</b> | <i>L. lactis</i> | 1F4a | 0,05 |
| <b>172</b> | <i>L. lactis</i> | 1F5a | 0,05 |
| <b>173</b> | <i>L. lactis</i> | 1F6c | 0,00 |
| <b>174</b> | <i>L. lactis</i> | 1F7a | 0,18 |
| <b>175</b> | <i>L. lactis</i> | 1F7b | 0,03 |
| <b>176</b> | <i>L. lactis</i> | 5    | 0,13 |
| <b>177</b> | <i>L. lactis</i> | 2F2a | 0,00 |
| <b>178</b> | <i>L. lactis</i> | 2F2c | 0,11 |
| <b>179</b> | <i>L. lactis</i> | 2F3b | 0,95 |
| <b>180</b> | <i>L. lactis</i> | 2F4a | 0,00 |
| <b>181</b> | <i>L. lactis</i> | 2F4b | 0,01 |

|     |   |       |      |
|-----|---|-------|------|
| 182 | <i>L. lactis</i>                                | 2F5b  | 0,44 |
| 183 | <i>L. lactis</i>                                | 7A1a  | 0,00 |
| 184 | <i>L. lactis</i>                                | 7A3a  | 0,00 |
| 185 | <i>L. lactis</i>                                | 7F1b  | 0,00 |
| 186 | <i>L. lactis</i>                                | 7F3b  | 0,00 |
| 187 | <i>L. lactis</i>                                | 7F4c  | 0,00 |
| 188 | <i>L. lactis</i>                                | 7F6b  | 0,47 |
| 189 | <i>L. lactis</i>                                | 7F7b  | 0,37 |
| 190 | <i>L. lactis</i>                                | 7F7d  | 0,13 |
| 191 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | D12   | 0,11 |
| 192 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | E2    | 0,00 |
| 193 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | G1    | 0,00 |
| 194 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | G9    | 0,00 |
| 195 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | F1    | 0,00 |
| 196 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | F2    | 0,00 |
| 197 | <i>S. thermophilus</i>                          | 1-1 c | 0,00 |
| 198 | <i>S. thermophilus</i>                          | 1-1 g | 0,00 |
| 199 | <i>S. thermophilus</i>                          | 38-1  | 0,00 |
| 200 | <i>S. thermophilus</i>                          | 41-1  | 0,00 |
| 201 | <i>S. thermophilus</i>                          | 45    | 0,00 |
| 202 | <i>S. thermophilus</i>                          | 45-1  | 0,00 |
| 203 | <i>S. thermophilus</i>                          | 46-4  | 0,00 |
| 204 | <i>S. thermophilus</i>                          | 72    | 0,00 |
| 205 | <i>S. thermophilus</i>                          | 74-1  | 0,00 |
| 206 | <i>S. thermophilus</i>                          | 78    | 0,00 |
| 207 | <i>S. thermophilus</i>                          | 79-2  | 0,00 |
| 208 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 4-1   | 0,00 |
| 209 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 14    | 0,00 |
| 210 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 18    | 0,00 |
| 211 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 22-2  | 0,09 |
| 212 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 26    | 0,00 |
| 213 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 29    | 0,00 |
| 214 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 50    | 0,00 |
| 215 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 57-1  | 0,00 |

|     |   |         |      |
|-----|---|---------|------|
| 216 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>     | 63      | 0,00 |
| 217 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>     | 67      | 0,00 |
| 218 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>     | 73-1    | 0,00 |
| 219 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>     | 75      | 0,00 |
| 220 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 84      | 0,00 |
| 221 | <i>Lb. helviticus</i>                           | 87      | 0,00 |
| 222 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 5.2  | 0,00 |
| 223 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 7.2  | 0,00 |
| 224 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 8A   | 0,03 |
| 225 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 8B   | 0,08 |
| 226 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 9B   | 0,28 |
| 227 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 10   | 1,43 |
| 228 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 10.1 | 0,00 |
| 229 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 11   | 0,21 |
| 230 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 12A  | 0,00 |
| 231 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 14   | 0,07 |
| 232 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 15   | 0,00 |
| 233 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 16   | 0,00 |
| 234 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 17A  | 0,00 |
| 235 | <i>S. thermophilus</i>                          | St 18   | 0,00 |
| 236 | <i>S. thermophilus</i>                          | St B10  | 0,00 |
| 237 | <i>S. thermophilus</i>                          | St C4   | 0,04 |
| 238 | <i>S. thermophilus</i>                          | St D3   | 0,01 |
| 239 | <i>S. thermophilus</i>                          | St D7   | 0,00 |
| 240 | <i>S. thermophilus</i>                          | St D9   | 0,00 |
| 241 | <i>S. thermophilus</i>                          | St E4   | 0,34 |
| 242 | <i>S. thermophilus</i>                          | St E5   | 0,01 |
| 243 | <i>S. thermophilus</i>                          | St E9   | 0,20 |
| 244 | <i>S. thermophilus</i>                          | St F9.1 | 1,53 |
| 245 | <i>S. thermophilus</i>                          | St F9.2 | 1,70 |
| 246 | <i>S. thermophilus</i>                          | St F6A  | 0,23 |
| 247 | <i>S. thermophilus</i>                          | St F6B  | 0,00 |
| 248 | <i>S. thermophilus</i>                          | St G4   | 0,31 |
| 249 | <i>S. thermophilus</i>                          | St H7   | 0,00 |

|            |   |           |      |
|------------|---|-----------|------|
| <b>250</b> | <i>L. lactis</i>                            | L LAC 441 | 1,42 |
| <b>251</b> | <i>S. thermophilus</i>                      | 6896      | 0,22 |
| <b>252</b> | <i>Lcb. casei</i>                           | 6904      | 0,00 |
| <b>253</b> | <i>Lvb. brevis</i>                          | 6906      | 2,01 |
| <b>254</b> | <i>Lvb. brevis gravesensis</i>              | 7934      | 0,00 |
| <b>255</b> | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> | 7942      | 0,88 |
| <b>256</b> | <i>Lb. gasseri</i>                          | 9203      | 1,35 |
| <b>257</b> | <i>Lb. reuteri</i>                          | 9213      | 0,14 |
| <b>258</b> | <i>Lb. acidophilus</i>                      | 9433      | 0,77 |
| <b>259</b> | <i>Bifidobacterium animalis</i>             | 10508     | 0,76 |
| <b>260</b> | <i>Lb. pentosus</i>                         | 10755     | 0,58 |
| <b>261</b> | <i>Bifidobacterium longum</i>               | 13197     | 1,43 |
| <b>262</b> | <i>Bifidobacterium breve</i>                | 13208     | 0,56 |

**Tabla 3.** Producción de GABA (mM) por aislados a partir de leche cruda, cuantificadas por cromatografía líquida UHPLC.

|                         | Aislado | Producción de GABA (mM) |
|-------------------------|---------|-------------------------|
| <b><i>L. lactis</i></b> |         |                         |
| 1                       | Lc.2.1  | 1,56                    |
| 2                       | Lc.2.4  | 0,20                    |
| 3                       | Lc.3.2  | 0,20                    |
| 4                       | Lc.3.4  | 2,14                    |
| 5                       | Lc.3.5  | 0,20                    |
| 6                       | Lc.5.2  | 3,60                    |
| 7                       | Lc.5.4  | 4,76                    |
| 8                       | Lc.5.5  | 4,88                    |
| 9                       | Lc.12.1 | 0,56                    |
| 10                      | Lc.12.2 | 0,56                    |
| 11                      | Lc.12.3 | 0,59                    |
| 12                      | Lc.12.4 | 0,55                    |
| 13                      | Lc.12.5 | 0,54                    |
| 14                      | Lc.12.6 | 0,57                    |
| 15                      | Lc.14.3 | 4,52                    |
| 16                      | Lc.14.4 | 5,05                    |
| 17                      | Lc.16.6 | 4,24                    |
| 18                      | Lc.19.3 | 4,55                    |
| 19                      | Lc.19.4 | 4,72                    |
| 20                      | Lc.19.5 | 4,54                    |

---

|    |         |      |
|----|---------|------|
| 21 | Lc.20.1 | 0,21 |
| 22 | Lc.20.3 | 0,29 |
| 23 | Lc.21.1 | 6,29 |
| 24 | Lc.21.2 | 0,51 |

***S. thermophilus***

|    |         |      |
|----|---------|------|
| 25 | St.1.1  | 2,84 |
| 26 | St.2.1  | 0,22 |
| 27 | St.3.1  | 0,23 |
| 28 | St.4.1  | 0,23 |
| 29 | St.5.1  | 0,23 |
| 30 | St.6.1  | 1,09 |
| 31 | St.7.1  | 0,28 |
| 32 | St.8.1  | 4,51 |
| 33 | St.9.1  | 3,95 |
| 34 | St.10.1 | 0,27 |
| 35 | St.11.1 | 0,27 |
| 36 | St.12.1 | 0,24 |
| 37 | St.13.1 | 0,26 |
| 38 | St.14.1 | 0,27 |
| 39 | St.15.1 | 0,27 |
| 40 | St.16.1 | 3,75 |
| 41 | St.17.1 | 0,25 |
| 42 | St.18.1 | 4,19 |
| 43 | St.19.1 | 0,27 |
| 44 | St.20.1 | 2,77 |
| 45 | St.21.1 | 3,90 |
| 46 | St.22.1 | 0,28 |
| 47 | St.23.1 | 0,28 |
| 48 | St.24.1 | 0,27 |

---



**ANEXO IV.** Características de las cepas productoras de GABA

**Tabla 1.** Análisis de distancia genómica de las cepas de *Lactococcus lactis* (A) y *Streptococcus thermophilus* (B) de este estudio con cepas tipo de especies relacionadas. Los resultados de la hibridación digital ADN-ADN (dDDH) se muestran debajo de la diagonal de autocomparación y los resultados de la identidad promedio de nucleótidos (OrthoANI) se muestran encima de la diagonal.

|  |      | ANI    |         |             |             |  |   |   |   |  |  |
|--|------|--------|---------|-------------|-------------|--|---|---|---|--|--|
|  |      | dDDH   |         |             |             |  |   |   |   |  |  |
| A  |      | Lc 5.5 | Lc 14.4 | Lc 19.3     | Lc 21.1     | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 1943 <sup>T</sup> | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> GL2 <sup>T</sup> | <i>L. cremoris</i> NBRC 100676 <sup>T</sup> | <i>L. cremoris</i> subsp. <i>tructae</i> DSM 21502 <sup>T</sup> | <i>L. allomyrinae</i> 1JSPR-7 <sup>T</sup> | <i>L. hircilactis</i> DSM 28960 <sup>T</sup> |
| Lc 5.5   |      | 97.5   | 99.2    | 98.5        | <u>98.6</u> | <b>98.5</b>  | 86.9  | 86.5  | 76.1  | 73.2                                       |  |
| Lc 14.4  | 74.5 |        | 97.6    | 97.4        | 97.3        | <u>97.4</u>  | 87.0  | 86.5  | 75.8  | 73.0                                       |  |
| Lc 19.3  | 92.6 | 78.4   |         | 98.7        | <u>98.7</u> | <b>98.6</b>  | 86.9  | 86.5  | 75.9  | 73.8                                       |  |
| Lc 21.1  | 87.0 | 76.9   | 87.3    |             | <u>98.8</u> | <u>99.5</u>  | 87.0  | 86.5  | 76.3  | 73.3                                       |  |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 <sup>T</sup>                       | 87.5 | 77.4   | 88.4    | 88.9        |             | <b>98.6</b>  | 87.0  | 86.6  | 76.0  | 73.3                                       |  |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> GL2 <sup>T</sup> | 87.7 | 77.6   | 88.6    | <u>95.3</u> | <b>87.9</b> |  | 86.5  | 86.5  | 75.8  | 73.0                                       |  |
| <i>Lactococcus cremoris</i> NBRC 100676 <sup>T</sup>   | 32.7 | 32.5   | 32.5    | 32.8        | 32.7        | 31.6   |   | 98.0  | 76.0  | 72.7                                       |  |
| <i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>tructae</i> DSM 21502 <sup>T</sup>                     | 32.0 | 31.6   | 31.8    | 31.8        | 31.7        | 31.4   | 83.6  |   | 75.9  | 72.7                                       |  |
| <i>Lactococcus allomyrinae</i> 1JSPR-7 <sup>T</sup>  | 22.3 | 22.3   | 22.2    | 22.5        | 22.5        | 21.3   | 23.3  | 22.4  |   | 72.2                                       |  |
| <i>Lactococcus hircilactis</i> DSM 28960 <sup>T</sup>  | 24.2 | 24.3   | 24.8    | 24.8        | 24.8        | 24.6   | 25.2  | 23.0  | 21.4  |  |  |

En negrita, valores con cepas tipo por encima de los umbrales de especie (95 % para ANI y 70 % para dDDH); subrayados, los valores más altos de orthoANI y dDDH.

| <b>B</b>   | dDDH        | ANI         |             |             |             |  |  |   |  |   |  |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|--|---|--|---|--|
|  |             | St 8.1      | St 9.1      | St 18.1     | St 21.1     | <i>S. thermophilus</i> ATCC 19258 <sup>T</sup> | <i>S. vestibularis</i> NCTC 12167 <sup>T</sup> | <i>S. salivarius</i> NCTC 8618 <sup>T</sup> | <i>S. rubneri</i> DSM 26920 <sup>T</sup> | <i>S. infantarius</i> ATCC BAA-102 <sup>T</sup> |  |
| St 8.1   |             | 99.4        | 99.9        | 99.4        | <b>98.8</b> | 92.2   | 89.1   | 72.6  | 72.5                                     |   |  |
| St 9.1   | <b>94.5</b> |             | 99.4        | 99.9        | <b>98.8</b> | 92.1   | 98.2   | 72.3  | 73.0                                     |   |  |
| St 18.1  | <b>99.8</b> | <b>94.6</b> |             | <b>99.4</b> | <b>98.7</b> | 92.1   | 89.3   | 72.7  | 71.9                                     |   |  |
| St 21.1  | <b>94.8</b> | <b>99.7</b> | <b>94.6</b> |             | <b>98.6</b> | 92.1   | 89.2   | 72.1  | 72.5                                     |   |  |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258 <sup>T</sup>  | <b>88.4</b> | <b>89.2</b> | <b>88.6</b> | <b>87.0</b> |             | 92.2   | 89.4   | 72.7  | 71.1                                     |   |  |
| <i>Streptococcus vestibularis</i> NCTC 12167 <sup>T</sup>  | 47.6        | 46.1        | 47.7        | 46.5        | 46.7        |  | 92.1   | 73.1  | 72.8                                     |   |  |
| <i>Streptococcus salivarius</i> NCTC 8618 <sup>T</sup>     | 37.6        | 37.7        | 37.6        | 37.6        | 37.9        | 46.2   |  | 73.4  | 72.9                                     |   |  |
| <i>Streptococcus rubneri</i> DSM 26920 <sup>T</sup>        | 26.2        | 26.3        | 26.2        | 26.3        | 26.5        | 29.3   | 27.4   |   | 71.1                                     |   |  |
| <i>Streptococcus infantarius</i> ATCC BAA-102 <sup>T</sup> | 25.5        | 25.0        | 25.6        | 25.0        | 26.6        | 25.8   | 25.7   | 21.7  |  |   |  |

En negrita, valores con cepas tipo por encima de los umbrales de especie (95 % para ANI y 70 % para dDDH); subrayados, los valores más altos de orthoANI y dDDH.

**Tabla 2.** Presencia de genes metabólicos implicados en el crecimiento en leche y en la formación de compuestos aromáticos (sabor y aroma) en el genoma de cuatro cepas de *Lactococcus lactis* productoras de GABA.

| Proteína/descripción                              | Gen/operón     | Función  | Cepa   |         |         |         |
|---|----------------|--|--------|---------|---------|---------|
|   |                |  | Lc 5.5 | Lc 14.4 | Lc 19.3 | Lc 21.1 |
| <b>Proteasas</b>                                  |                |  |        |         |         |         |
| Metaloproteasa de zinc dependiente de ATP         | <i>ftsH</i>    | Escisión de secuencias transmembrana, división celular   | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Proteasa amino terminal CAAX                      | -              | -  | -      | 1       | 1       | -       |
| Proteinasa caseinolítica unida a la pared celular | <i>prtP</i>    | Digestión de caseínas lácteas  | 1      | 1       | 1       | -       |
| Proteasa clp                                      | <i>clpCEPX</i> | Rotación de proteínas celulares  | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Serina proteasa DegP/HtrA                         | <i>htrA</i>    | Eliminación de proteínas desnaturalizadas o agregadas de la membrana interna y el espacio periplásmico | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Proteasa de procesamiento de competencia tardía   | <i>comC</i>    | Procesamiento del ADN durante la captación   | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Proteasa tipo Lon con dominio PDZ                 | -              | Control de calidad de las proteínas  | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Proteasa RasP/YluC                                | -              | -  | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Serin proteasa romboide                           | -              | -  | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Represor de respuesta SOS y proteasa              | <i>lexA</i>    | Auto proteólisis en respuesta SOS  | 1      | 1       | -       | 1       |
| Proteasa YmfH                                     | <i>ymfH</i>    | -  | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Proteasa YrrO                                     | <i>yrrO</i>    | -  | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Proteasa Zinc                                     | -              | -  | 1      | 1       | 1       | 1       |
| <b>Peptidasas</b>                                 |                |  |        |         |         |         |
| Aminopeptidasa                                    | <i>ypdF</i>    | Hidroliza los enlaces Xaa-Pro cuando Xaa es Ala, Asn o Met   | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Aminopeptidasa C                                  | <i>pepC</i>    | Cisteína aminopeptidasa general  | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Dipeptidasa                                       | <i>pepQ</i>    | Degradación de dipéptidos  | 2      | 2       | 2       | 2       |
| Glutamil aminopeptidasa                           | <i>pepA</i>    | Aminopeptidasa de péptidos Asp y Glu   | 1      | 1       | 1       | 1       |
| Lisil aminopeptidasa                              | <i>pepN</i>    | Aminopeptidasa general   | 1      | 1       | 1       | 1       |

|  |             |   |   |   |   |   |
|--|-------------|---|---|---|---|---|
| Metionina aminopeptidasa                     | <i>pepM</i> | Liberación de Met a partir de proteínas y péptidos                  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transpeptidasa-transglicosilasa multimodular | -           | Biosíntesis de peptidoglicanos, probablemente PBP                   | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Muramoyl tetrapéptido carboxipeptidasa       | -           | -   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Endopeptidasa neutra                         | -           | Endopeptidasas  | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Oligoendopeptidasa F                         | <i>pepF</i> | Hidroliza péptidos largos de 7 a 17 aminoácidos                     | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Peptidasa E                                  | <i>pepE</i> | Liberación de Asp N-terminal  | - | 1 | - | - |
| Familia de la peptidasa U32                  | -           | -   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Prolina imidopeptidasa                       | <i>pepD</i> | Escinde dipéptidos cuando Pro está en el extremo carboxilo terminal | 1 | - | - | - |
| Pyrrolidona-carboxilato peptidasa            | <i>pcp</i>  | Elimina el piroglutamato de proteínas y péptidos                    | 1 | - | 1 | 1 |
| Metalopeptidasa de zinc de la familia SprT   | <i>sprT</i> | -   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tripéptido aminopeptidasa                    | <i>pepT</i> | Amino degradación de tripéptidos                                    | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Xaa-His dipeptidasa                          | <i>pepV</i> | Hidrólisis de Xaa-His y dipéptidos generales                        | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Xaa-Pro dipeptidil peptidasa                 | <i>pepX</i> | Libera dipéptidos cuando Pro está en la segunda posición            | 1 | 1 | 1 | 1 |

#### Transportadores de lactosa, aminoácidos y péptidos

|   |               |  |   |   |   |   |
|---|---------------|--|---|---|---|---|
| Permeasa de aminoácidos   | <i>gabP</i>   | Transporte de aminoácidos                      | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Antiportador de arginina/ornitina                                     | <i>arcD</i>   | Transporte de arginina                         | 2 | 1 | 2 | 3 |
| Transportador ABC de aminoácidos básicos/glutamina                    | -             | Transporte de aminoácidos básicos              | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Transportador de aminoácidos de cadena ramificada (dependiente de Na) | <i>brnQ</i>   | Transporte de aminoácidos de cadena ramificada | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador de aminoácidos catiónicos                               | <i>yckB</i>   | Transporte de aminoácidos básicos              | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador de citrato  | <i>citQRP</i> | Transporte de citrato                          | - | - | - | 1 |
| Transportador ABC de cisteína   | -             | Transporte de cisteína                         | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Di-tripéptido/simportador de cationes DtpT                            | <i>dtpT</i>   | Transporte de di- y tripéptidos                | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Antiportador de glutamato/gamma-aminobutirato                         | <i>gadC</i>   | Transporte de glutamato                        | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Transportador ABC de glutamina  | <i>glnHPQ</i> | Transporte de aminoácidos básicos              | 1 | 1 | 1 | 1 |

|   |                |   |   |   |   |   |
|---|----------------|---|---|---|---|---|
| Lactosa, galactosa permeasa (translocador de GPH) | <i>lacP</i>    | Transporte de lactosa   | 1 | - | 1 | 1 |
| Sistema PTS específico de lactosa                 | <i>lacABC</i>  | Transporte y fosforilación de lactosa   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador ABC de metionina                    | -              | Transporte de Met   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador ABC de metionina / fosfonatos       | -              | Transporte de Met   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador oligopéptido ABC                    | <i>oppABCF</i> | Transporte de oligopéptidos   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <b>Aminotransferasas y transaminasas</b>          |                |   |   |   |   |   |
| Alanina transaminasa                              | -              | Síntesis de Arg, Ala, Asp, metabolismo de Glu   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Aminoácido aromático aminotransferasa gamma       | <i>araT</i>    | Transferencia de grupos α-amino entre aminoácidos aromáticos  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Aspartato aminotransferasa                        | -              | Transferencia reversible de un grupo α-amino entre Asp y Glu  | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada  | <i>bcaT</i>    | Síntesis y metabolismo de Cys, Val, Leu, Iso, Met, síntesis de metabolitos secundarios                    | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Glutamina amidotransferasa, clase I               | <i>pfl</i>     | Eliminación del grupo amoníaco de la glutamina  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa     | <i>glmS</i>    | Metabolismo de Ala, Glu, vías metabólicas   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Histidinol-fosfato aminotransferasa               | -              | Vías metabólicas de Glu, His  | 1 | 1 | 1 | - |
| Transpeptidasa-transglucosidasa multimodular      | -              | -   | 3 | 3 | 3 | 3 |
| N-acetil-L,L-diaminopimelato aminotransferasa     | -              | Metabolismo de Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, Thr, degradación de Lys, metabolismo del piruvato                 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| N-acetilornitina aminotransferasa                 | <i>rocD</i>    | Biosíntesis de Arg, vías metabólicas, metabolitos secundarios   | - | 1 | 1 | 1 |
| Fosfoserina aminotransferasa                      | -              | Metabolismo de Gly, Ser, Thr, Cys, Met, metabolitos secundarios   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Serina-piruvato aminotransferasa                  | -              | Metabolismo de Gly, Ser, Thr  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <b>Deshidrogenasas</b>                            |                |   |   |   |   |   |
| 2,3-butanodiol deshidrogenasa (R-S)               | -              | Biosíntesis de metabolitos secundarios  | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Acetaldehído deshidrogenasa                       | <i>adhE</i>    | Degradoación de ácidos grasos, síntesis y degradación de aminoácidos, síntesis de metabolitos secundarios | 2 | 1 | 1 | 1 |

|   |               |   |   |   |   |   |
|---|---------------|---|---|---|---|---|
| Alanina deshidrogenasa                        | <i>ala-dh</i> | Metabolismo de Ala, Asp, y Glu, vías metabólicas                                      | 1 | 3 | - | 1 |
| Alcohol deshidrogenasa clase III              | <i>adh</i>    | Glucólisis, degradación de ácidos grasos, metabolismo de Tyr, metabolismo de piruvato | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Aspartato-semialdehído deshidrogenasa         | -             | Metabolismo de Gly, Thr, Cys, Met, síntesis de Lys                                    | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-lactato deshidrogenasa                      | <i>ldhD</i>   | Síntesis de metabolitos secundarios   | - | - | 1 | 1 |
| Homoserina deshidrogenasa                     | -             | Metabolismo de Gly, Ser, Thr, Cys, Met, síntesis de Lys, vías metabólicas             | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L-lactato deshidrogenasa                      | <i>ldhL</i>   | Glucólisis, metabolismo de Cys, Met, metabolitos secundarios                          | 3 | 4 | 4 | 3 |
| L-lactato deshidrogenasa, Fe-S oxidoreductasa | <i>ykgEFG</i> | Glucólisis, metabolismo de Cys, Met, metabolitos secundarios                          |   |   |   | 1 |

**Liasas**

|                                 |                 |  |   |   |   |   |
|---------------------------------|-----------------|--|---|---|---|---|
| Argininosuccinato liasa/sintasa | -               | Biosíntesis de Arg, Ala, Asp, Metabolismo de Glu, Vías metabólicas, biosíntesis de metabolitos secundarios | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Complejo de citrato liasa       | <i>citCDEFG</i> | Formación de piruvato a partir de citrato  | - | 1 | - | 1 |
| Cistationina beta-liasa         | <i>cglB</i>     | Producción de compuestos de azufre   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Cistationina beta-sintasa       | <i>cbs</i>      | Transulfuración de homocisteína a cistationina   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Cistationina gamma-liasa        | <i>cglA</i>     | Metabolismo de Gly, Ser, Met, Cys, Thr, vías metabólicas   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Cistationina gamma-sintasa      | <i>cgs</i>      | Formación de cistationina a partir de cisteína   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| S-ribosilhomocisteína liasa     | -               | Metabolismo de Cys, Met, vías metabólicas  | 1 | 1 | 1 | 1 |

**Esterasas/lipasas**

|  |             |  |    |    |    |    |
|--|-------------|--|----|----|----|----|
| Alfa/beta hidrolasa (proteína de la familia HAD) | -           | Transporte y metabolismo de lípidos                | 11 | 10 | 11 | 10 |
| Carboxilesterasa                                 | <i>est</i>  | Amplia especificidad que actúa sobre enlaces éster | 1  | 1  | 1  | 1  |
| Esterasa/lipasa                                  | -           | Transporte y metabolismo de lípidos                | 1  | 1  | 1  | 1  |
| Glicerofosforil diéster fosfodiesterasa          | <i>glpQ</i> | Metabolismo de glicerofosfolípidos                 | 2  | 2  | 2  | 2  |
| Lipasa/Acilhidrolasa                             | -           | -  | 2  | 2  | 2  | 2  |
| Lisofosfolipasa/lipasa monoglicérido             | -           | -  | 1  | 1  | 1  | 1  |

|                      |   |   |   |   |   |   |
|----------------------|---|---|---|---|---|---|
| Fosfoesterasa        | - | Liberación de proteínas unidas a membrana con anclajes de<br>Glicosilfosfatidilinositol | 2 | 2 | 1 | 2 |
| Tributirina esterasa | - | Hidrólisis de ácidos grasos C2-C16  | 1 | 1 | 1 | 1 |

En amarillo se resaltan las diferencias en el contenido genético entre las cepas de *L. lactis* y en verde los genes específicos de la especie en comparación con las cepas de *Streptococcus thermophilus* en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Presencia de genes metabólicos implicados en el crecimiento en la leche y en la formación de compuestos aromáticos (sabor y aroma) en el genoma de cuatro cepas de *Streptococcus thermophilus* productoras de GABA.

| Proteína/descripción                              | Gen/operón     | Función  | Cepa   |        |        |         |
|---|----------------|--|--------|--------|--------|---------|
|   |                |  | St 8.1 | St 9.1 | St18.1 | St 21.1 |
| <b>Proteasas</b>                                  |                |  |        |        |        |         |
| Metaloproteasa de zinc dependiente de ATP         | <i>ftsH</i>    | Escisión de secuencias transmembrana, división celular   | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Proteasa amino terminal CAAX                      | -              | -  | 1      | -      | 1      | -       |
| Proteasa unida a membrana CAAX                    | -              | -  | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Proteinasa caseinolítica unida a la pared celular | <i>prtS</i>    | Digestión de caseínas lácteas  | 1      | -      | 1      | -       |
| Proteasa clp                                      | <i>cldCEPX</i> | Rotación de proteínas celulares  | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Serina proteasa DegP/HtrA                         | <i>htrA</i>    | Eliminación de proteínas desnaturizadas o agregadas de la membrana interna y el espacio periplásmico | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Proteasa de procesamiento de competencia tardía   | <i>comC</i>    | Procesamiento del ADN durante la captación   | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Proteasa tipo Lon con dominio PDZ                 | -              | Control de calidad de las proteínas  | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Proteasa RasP/YluC                                | -              | -  | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Proteasa YmfH                                     | <i>ymfH</i>    | -  | -      | 1      | -      | 1       |
| Proteasa YrrO                                     | <i>yrrO</i>    | -  | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Proteasa Zinc                                     | -              | -  | 1      | 1      | 1      | 1       |
| <b>Peptidasas</b>                                 |                |  |        |        |        |         |
| Aminopeptidasa                                    | <i>ypdF</i>    | Hidroliza los enlaces Xaa-Pro cuando Xaa es Ala, Asn o Met   | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Aminopeptidasa C                                  | <i>pepC</i>    | Cisteína aminopeptidasa general  | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Aminopeptidasa S                                  | <i>pepS</i>    | Clivaje de preferencia Leu, Val, Phe y Tyr   | 1      | 1      | 1      | 1       |
| Dipeptidasa                                       | <i>pepQ</i>    | Degradoación de dipéptidos   | -      | 1      | -      | 1       |
| Glutamilo aminopeptidasa                          | <i>pepA</i>    | Aminopeptidasa de péptidos Asp y Glu   | 1      | 1      | 1      | 1       |

|                              |             |  |   |   |   |   |
|------------------------------|-------------|--|---|---|---|---|
| Lisil aminopeptidasa         | <i>pepN</i> | Aminopeptidasa general                                     | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Metionina aminopeptidasa     | <i>pepM</i> | Liberación de Met a partir de proteínas y péptidos         | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Endopeptidasa neutra O       | <i>pepO</i> | Endopeptidasa  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Oligoendopeptidasa F         | <i>pepF</i> | Hidroliza péptidos largos de 7 a 17 aminoácidos            | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Familia de la peptidasa U32  | -           | -  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Prolina imidopeptidasa       | <i>pepD</i> | Escinde dipéptidos cuando Pro está en el extremo carboxilo | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tripéptido aminopeptidasa    | <i>pepT</i> | Aminodegradación de tripéptidos                            | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Xaa-His dipeptidasa          | <i>pepV</i> | Hidrólisis de Xaa-His y dipéptidos generales               | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Xaa-Pro dipeptidil peptidasa | <i>pepX</i> | Libera dipéptidos cuando Pro esté en la segunda posición   | 1 | 1 | 1 | 1 |

#### Transportadores de lactosa, aminoácidos y péptidos

|   |                 |  |   |   |   |   |
|---|-----------------|--|---|---|---|---|
| Permeasa de aminoácidos   | <i>gabP</i>     | Transporte de aminoácidos                      | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Permeasa de aminoácidos   | <i>ydaO</i>     | Transporte de aminoácidos                      | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador ABC de aminoácidos básicos/glutamina                    | -               | Transporte de aminoácidos básicos              | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador de aminoácidos de cadena ramificada                     | <i>livFGHJM</i> | Transporte de Leu, Iso, Val                    | 1 |   |   |   |
| Transportador de aminoácidos de cadena ramificada                     | <i>azlC</i>     | -  | 1 |   |   |   |
| Transportador de aminoácidos de cadena ramificada (dependiente de Na) | <i>brnQ</i>     | Transporte de aminoácidos de cadena ramificada | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador de aminoácidos catiónicos                               | <i>yckB</i>     | Transporte de aminoácidos básicos              | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador ABC de cisteína   | -               | Transporte de cisteína                         | 1 | 2 | 2 | 1 |
| Ditripéptido/simportador de cationes DtpT                             | <i>dtpT</i>     | Transporte de di y tripéptidos                 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Antiportador de glutamato/gamma-aminobutirato                         | <i>gadC</i>     | Transporte de glutamato                        | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador ABC de glutamina  | <i>glnHPQ</i>   | Transporte de aminoácidos básicos              | 1 | 1 | 1 | 1 |

|   |                 |  |   |   |   |   |
|---|-----------------|--|---|---|---|---|
| Lactosa, galactosa permeasa (translocador de GPH)               | <i>lacP</i>     | Transporte de lactosa  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador ABC de metionina                                  | -               | Transporte de Met  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transportador oligopéptido ABC                                  | <i>oppABCDF</i> | Transporte de oligopéptidos  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Simportador de Na <sup>+</sup> serina/treonina                  | <i>sstT</i>     | Transporte de Ser, Thr   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Simportador de sodio/glicina GlyP                               | <i>glyP</i>     | Transporte de Gly  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <b>Aminotransferasas y transaminasas</b>                        |                 |  |   |   |   |   |
| Alanina transaminasa  | -               | Síntesis de Arg, Ala, Asp, metabolismo de Glu  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Aminoácido aromático aminotransferasa gamma                     | <i>araT</i>     | Transferencia de grupos α-amino entre aminoácidos aromáticos                           | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Aspartato aminotransferasa                                      | <i>aspAT</i>    | Transferencia reversible de un grupo α-amino entre Asp y Glu                           | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada                | <i>bcaT</i>     | Cys, Val, Leu, Iso, Met, síntesis y metabolismo. Síntesis de metabolitos secundarios   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Glutamina amidotransferasa, clase I                             | <i>pfpI</i>     | Eliminación del grupo amoníaco de la glutamina   | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Transaminasa 2-ceto-4-metiltiobutirato dependiente de glutamina | -               | Metabolismo de Met, Cys, vías metabólicas  | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa                   | <i>glmS</i>     | Metabolismo de Ala, Glu, vías metabólicas  | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Histidinol-fosfato aminotransferasa                             | -               | Vías metabólicas de Glu, His   | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Transpeptidasa-transglucosidasa multimodular                    | -               | -  | 2 | 2 | 2 | 2 |
| N-acetil-L,L-diaminopimelato aminotransferasa                   | -               | Metabolismo Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, Thr, degradación de Lys, metabolismo del piruvato | 1 | 1 | 1 | 1 |
| N-acetilornitina aminotransferasa                               | <i>rocD</i>     | Biosíntesis de Arg, vías metabólicas, metabolitos secundarios                          | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Fosfoserina aminotransferasa                                    | -               | Metabolismo Gly, Ser, Thr, Cys, Met, metabolitos secundarios                           | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <b>Deshidrogenasas</b>  |                 |  |   |   |   |   |
| 2,3-butanodiol deshidrogenasa (R-S)                             | -               | Biosíntesis de metabolitos secundarios   | 1 | 1 | 1 | 1 |

|  |               |  |   |   |    |   |
|--|---------------|--|---|---|----|---|
| Alanina deshidrogenasa                           | <i>ala-dh</i> | Metabolismo de Glu, Ala, Asp, vías metabólicas   | 1 | 1 | 1  | 1 |
| Aspartato-semialdehído deshidrogenasa            | -             | Metabolismo de Gly, Thr, Cys, Met. Síntesis de Lys   | 1 | 1 | 1  | 1 |
| Glutamato deshidrogenasa (específica de NADP)    | <i>gdhA</i>   | Síntesis de Arg, Ala, Asp, metabolismo, vías metabólicas   | 1 | 1 | 1  | 1 |
| Homoserina deshidrogenasa                        | -             | Metabolismo de Gly, Ser, Thr, Cys, Met. Síntesis de Lys, vías metabólicas                                  | 1 | 1 | 1  | 1 |
| L-lactato deshidrogenasa                         | <i>ldhL</i>   | Glucólisis. Metabolismo de Cys, Met. Metabolitos secundarios   | 2 | 2 | 2  | 2 |
| <b>Liasas</b>                                    |               |  |   |   |    |   |
| Argininosuccinato liasa/sintasa                  | -             | Biosíntesis de Arg. Metabolismo de Ala, Asp, Glu. Vías metabólicas, biosíntesis de metabolitos secundarios | 1 | 1 | 1  | 1 |
| Cistationina beta-liasa                          | <i>cglB</i>   | Producción de compuestos de azufre   | 1 | 1 | 1  | 1 |
| Cistationina beta-sintasa                        | <i>cbs</i>    | Transulfuración de homocisteína a cistationina   |   |   |    |   |
| Cistationina gamma-liasa                         | <i>cglA</i>   | Metabolismo de Gly, Ser, Met, Cys, Thr, vías metabólicas   | 1 | 1 | 1  | 1 |
| Cistationina gamma-sintasa                       | <i>cgs</i>    | Formación de cistationina a partir de cisteína   | 1 | 1 | 1  | 1 |
| D-histidina amoniaco-liasa                       | -             | Metabolismo de Gly, Ser, Thr, metabolismo de D-aminoácidos, vías metabólicas                               | 1 | 1 | 1  | 1 |
| S-ribosilhomocisteína liasa                      | <i>luxS</i>   | Metabolismo de Cys, Met, vías metabólicas  | 1 | 1 | 1  | 1 |
| <b>Esterasas/lipasas</b>                         |               |  |   |   |    |   |
| Alfa/beta hidrolasa (proteína de la familia HAD) | -             | Transporte y metabolismo de lípidos  | 7 | 9 | 10 | 8 |
| Esterasa/lipasa                                  | -             | Transporte y metabolismo de lípidos  | 1 | 1 | 1  | 1 |
| Fosfoesterasa                                    | -             | Liberación de proteínas unidas a membrana con anclajes de glicosilfosfatidilinositol                       | 1 | 1 | 1  | 1 |
| Tiosterasa                                       | -             | Metabolismo de los ácidos grasos   | 3 | 3 | 3  | 3 |
| Tributirina esterasa                             | -             | Hidrólisis de ácidos grasos C2-C16   | 1 | 1 | 1  | 1 |

Resaltadas en amarillo están las diferencias en el contenido genético entre las cepas de *S. thermophilus* y en verde los genes específicos de la especie en comparación con las cepas de *Lactococcus lactis* de la Tabla 2.

**ANEXO V.** Elaboración de productos lácteos**Número de Catador/a:****Fecha:****Edad:****Género:** masculino/femenino**Eres consumidor habitual de yogures? Si / No****INSTRUCCIONES:** Indicar el grado de aceptación (me gusta o no me gusta) de los atributos correspondientes a cada muestra.

Siendo 1 (no me gusta nada) y 5 (me gusta mucho). Si se detectan otros atributos especificar en el apartado "Otro" detallando la característica percibida.

**Por ejemplo:** si se identifica que el producto está muy compacto y a mí me gusta muy cremoso pondré 1 (ya que no me gusta nada). Por el contrario, si el producto está muy compacto y a mí me gusta muy compacto pondré 5 (ya que me gusta mucho).**Puntuar los atributos rodeando un número en una escala**

| ATRIBUTO | Código de la muestra:    |   |                |   |   | Código de la muestra: |   |                |   |   | Código de la muestra: |   |                |   |   |   |
|----------|--------------------------|---|----------------|---|---|-----------------------|---|----------------|---|---|-----------------------|---|----------------|---|---|---|
|          | No me gusta nada         |   | Me gusta mucho |   |   | No me gusta nada      |   | Me gusta mucho |   |   | No me gusta nada      |   | Me gusta mucho |   |   |   |
| Aspecto  | <b>Compacto</b>          | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Con suero</b>         | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Roto</b>              | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Otro (definir)</b>    | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
| Aroma    | <b>Leche</b>             | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>A mantequilla</b>     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Yogur</b>             | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Otro (definir)</b>    | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
| Textura  | <b>Cremosa*</b>          | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Arenosa</b>           | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Homogénea**</b>       | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Otro (definir)</b>    | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
| Sabor    | <b>Ácido</b>             | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Dulce</b>             | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Amargo</b>            | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>A yogur</b>           | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Otro (definir)</b>    | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |
|          | <b>Aceptación Global</b> | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5                     | 1 | 2              | 3 | 4 | 5 |

\*Cremosidad: presenta una textura similar o igual al yogur griego (5) - \*\* Homogeneidad: presenta una textura uniforme, lisa (ejemplo mármol: 5)

**Observaciones:** \_\_\_\_\_**Figura 1.** Formulario de degustación de yogur.