

Red Iberoamericana de la calidad e  
inocuidad de quesería artesanal



# **Capacidad probiótica y de producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA) de cultivos naturales en la quesería artesanal uruguaya**

MSc. Joaquín Lozano  
[joaquinlozano22cb@gmail.com](mailto:joaquinlozano22cb@gmail.com)

Dr. Pablo Zunino  
Departamento de Microbiología,  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable  
Montevideo, Uruguay

**Montevideo,  
Uruguay  
2024**

# Quesería artesanal nacional

Origen en la inmigración italiana y suiza en la segunda mitad del Siglo XIX

Unos 900 productores

80 % se ubica en los departamentos de Colonia y San José

Caracterizada por el uso de suero fermentos naturales



# Suero fermento natural (SFN)

Los SFN son cultivos iniciadores complejos formados por asociaciones de microorganismos, integrados por bacterias ácido lácticas dominantes, junto con otros microorganismos, como levaduras.

La mezcla de este suero con la microbiota proveniente de la leche cruda le dan al queso sus características.

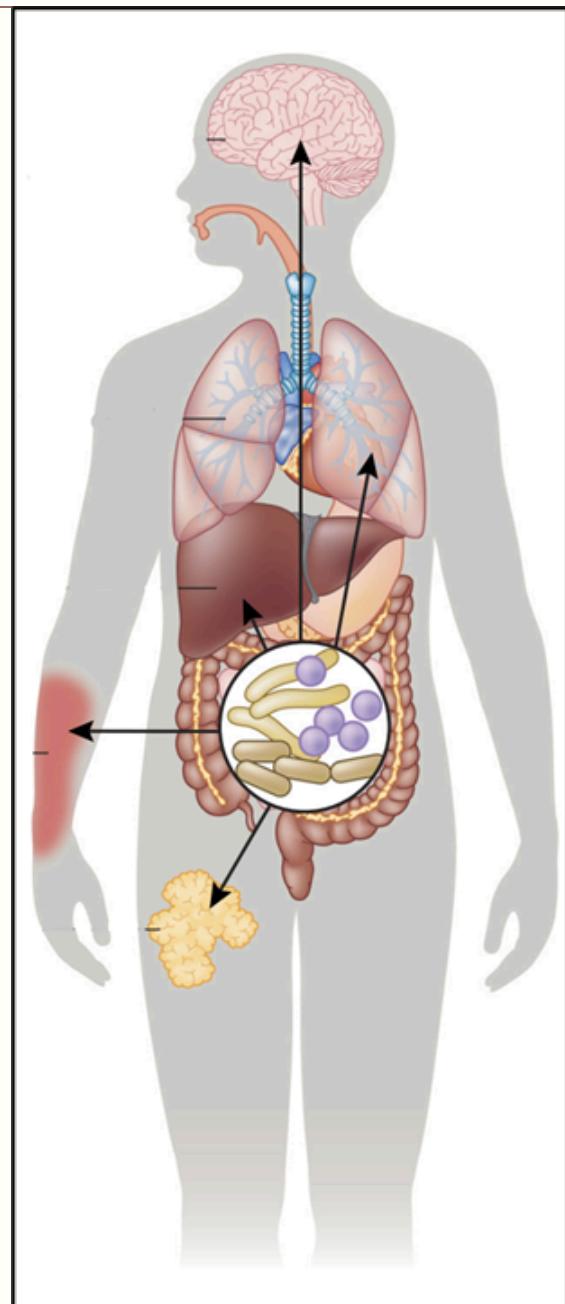


# Microbiota Intestinal

Es la comunidad microbiana (bacterias, arqueas, hongos, virus y protozoarios) que reside en el intestino.

Contribuye con la salud del hospedero en la digestión de polisacáridos complejos, protección del hospedero frente a patógenos, modulación de la respuesta inmune y protección ante enfermedades metabólicas, entre otras funciones.

(Collins *et al.*, 2012)

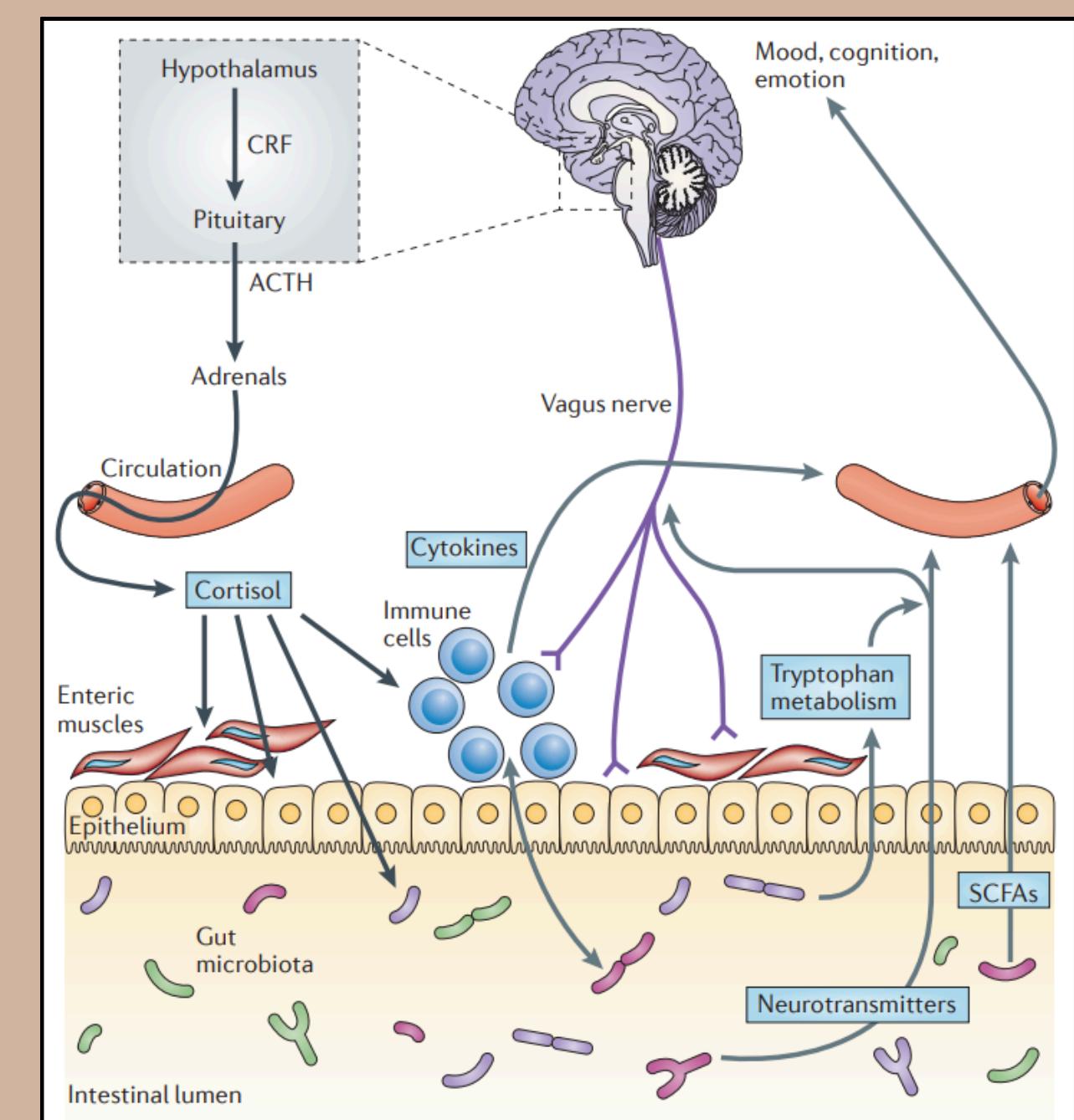


# Eje Microbiota-Intestino-Cerebro

Es el canal de comunicación bidireccional entre la microbiota intestinal y el cerebro que abarca múltiples sistemas de conexión.

A través de este eje, la microbiota y el cerebro se comunican entre sí por varias vías, incluyendo el sistema nervioso, nervio vago, sistema inmunitario y la producción y metabolismo bacteriano de sustancias neuroactivas (Cryan *et al.*, 2019).

Está involucrado en la fisiopatología de trastornos mentales.

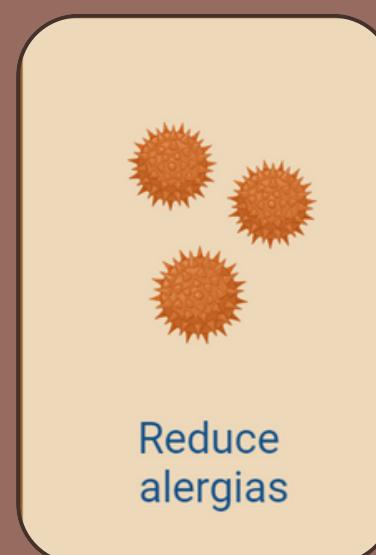


Cryan *et al* 2012

# Probióticos

Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero. (WHO, 2017)

Los mecanismos de acción propuestos son muy variados que se podrían asociar directamente entre la cepa y el hospedero o con la modulación de la MI.



**Journal of Mental Science, Volume 56, Issue 234** July 1910, pp. 422-430

This volume was published under a former title. [See this journal's title history.](#)

## The Treatment of Melancholia by the Lactic Acid Bacillus

J. George Porter Phillips <sup>(a1)</sup> 

DOI: <https://doi.org/10.1192/bjp.56.234.422> Published online by Cambridge University Press: 19 February 2018

### Extract

Melancholia, with its attendant constipation and faulty alimentation, lends itself at once to a dietetic form of treatment.

Whether the constipation is dependent on defective innervation and is a direct symptom of melancholia or is the initial cause of this mental disturbance, it matters not so far as our endeavours in treatment are concerned.

*The Treatment of Melancholia by the Lactic Acid Bacillus.* <sup>(1)</sup> By J. GEORGE PORTER PHILLIPS, M.B., B.S. (Lond.), M.R.C.S., L.R.C.P., Assistant Physician, Bethlem Royal Hospital.

MELANCHOLIA, with its attendant constipation and faulty alimentation, lends itself at once to a dietetic form of treatment.

Whether the constipation is dependent on defective innervation and is a direct symptom of melancholia or is the initial cause of this mental disturbance, it matters not so far as our endeavours in treatment are concerned.

It is obvious that the melancholiac, in the acute stages of his illness, struggles against great odds owing to the following facts: His alimentation is defective, his excretions are diminished, and, moreover, his whole system is in a state of auto-intoxication. In other words there is a general clogging of the metabolic processes. The disturbance of the alimentary tract tends to form a vicious cycle hindering the nervous system from obtaining an efficient and pure food supply.

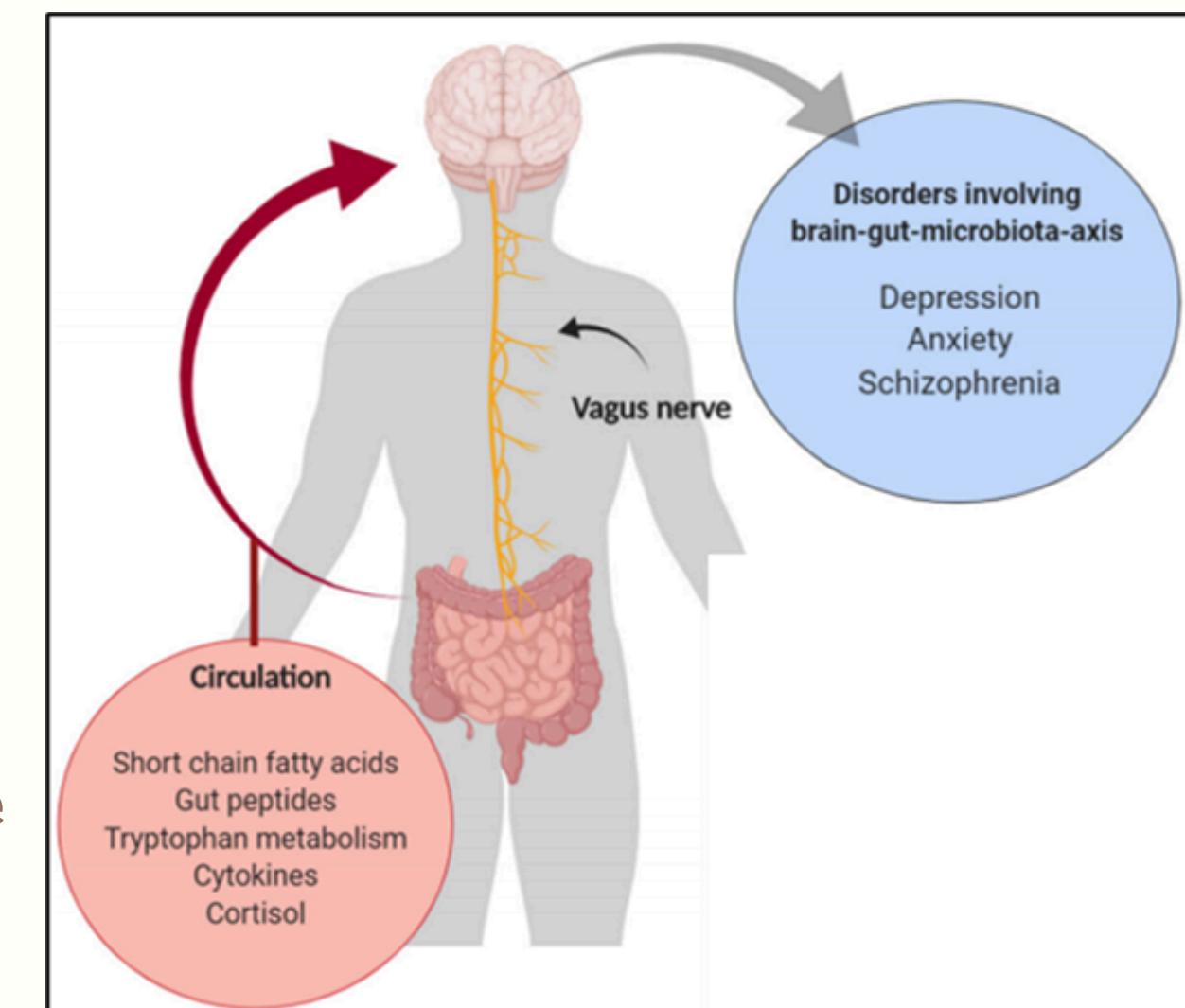
We have ample evidence of this impaired metabolism with its toxæmia. The patient has a sallow, muddy complexion, a dry skin, a parched, furred tongue, a high-tension pulse, brittle nails and lustreless hair, a scanty high-coloured urine

# Probióticos y salud mental

Efectos beneficiosos probados frente a patologías neurodegenerativas y psiquiátricas como depresión y ansiedad.

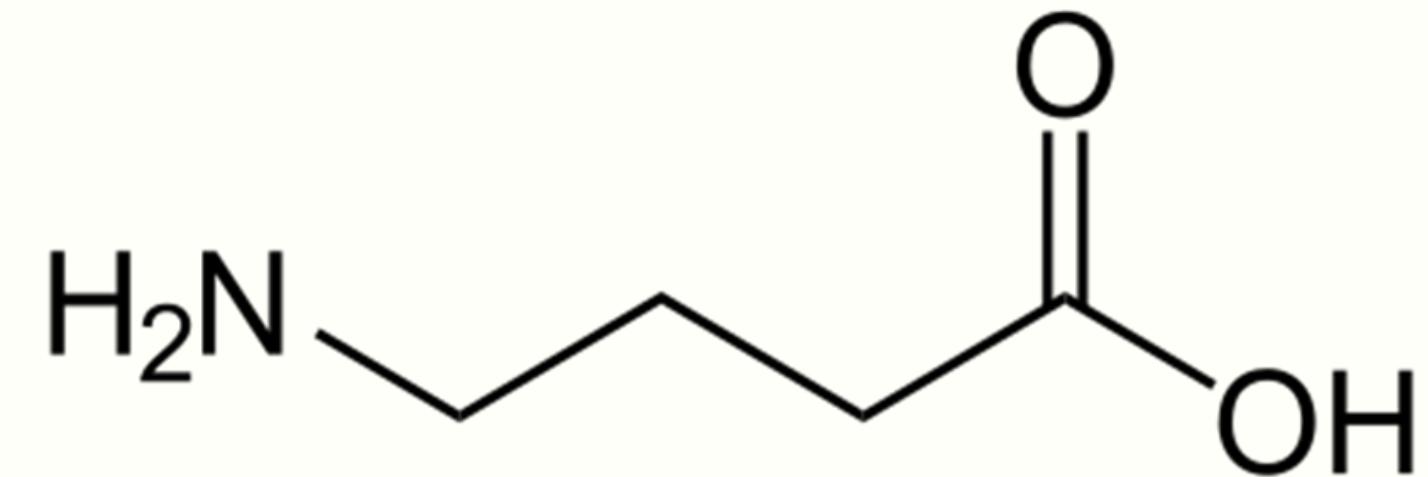
Los mecanismos de acción principales son:

- La modulación del sistema inmune
- La modulación del sistema nervioso entérico
- La modulación de la microbiota intestinal
- La producción microbiana de AGCC y neurotransmisores como serotonina y GABA entre otros.



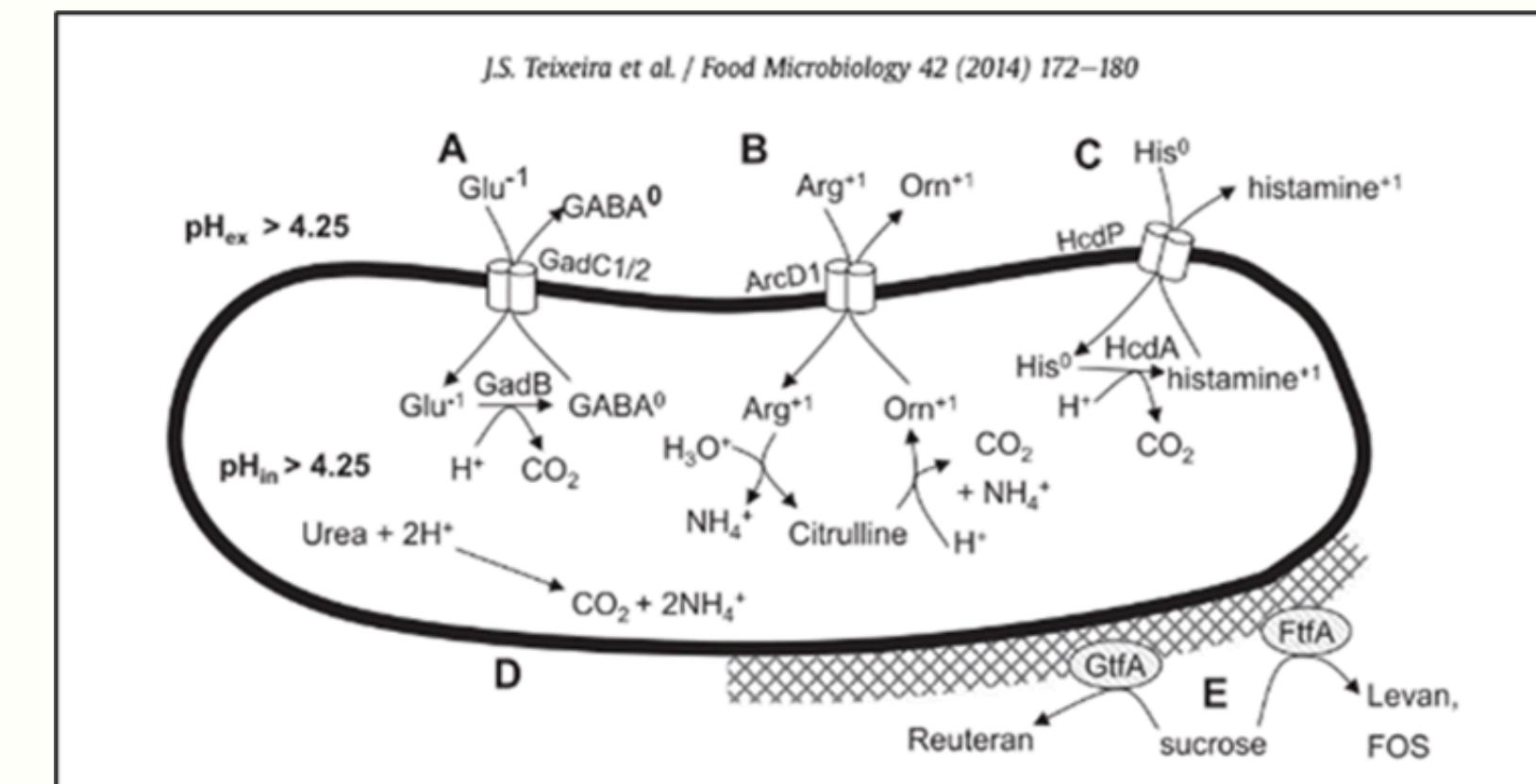
# Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)

- Aminoácido no proteico
- Principal neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso en mamíferos
- Es sintetizado por mamíferos, insectos, plantas e incluso bacterias



# Producción bacteriana de GABA

La principal función de GABA en bacterias es la de formar un sistema de resistencia al estrés acídico mediante la descarboxilación del glutamato.



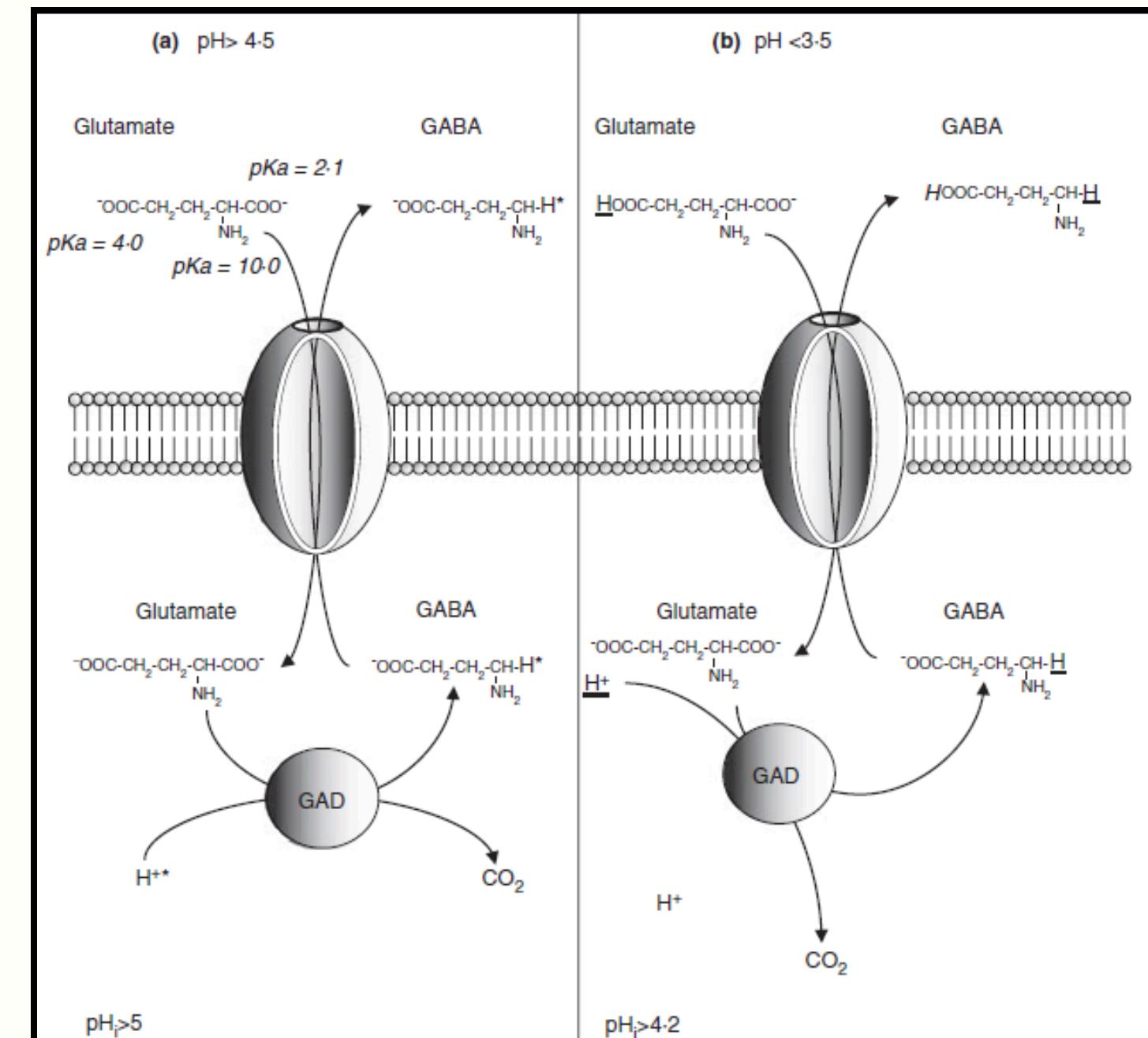
Toda esta maquinaria molecular se encuentra codificada dentro del operón *gad*, el cual es activado en medios con abundancia de aminoácidos libres y pH bajos.

# Operón *gad*

El operón se encuentra formado por los genes codificantes para la enzima glutamato descarboxilasa y la proteína de canal antiporter glutamato-GABA (Feehily & Karatzas, 2012).

Activado en condiciones de estrés acídico.

Medios ácidos, con gran cantidad de aminoácidos libres. Selectivo para bacterias con el operón gad



# Hipótesis

---

Los SFN son repositorios naturales de bacterias con potencial probiótico, algunas de las cuales, al ser administradas en forma crónica, tienen la capacidad de generar cambios comportamentales beneficiosos a través de la modulación del eje MIC.

# Objetivo general

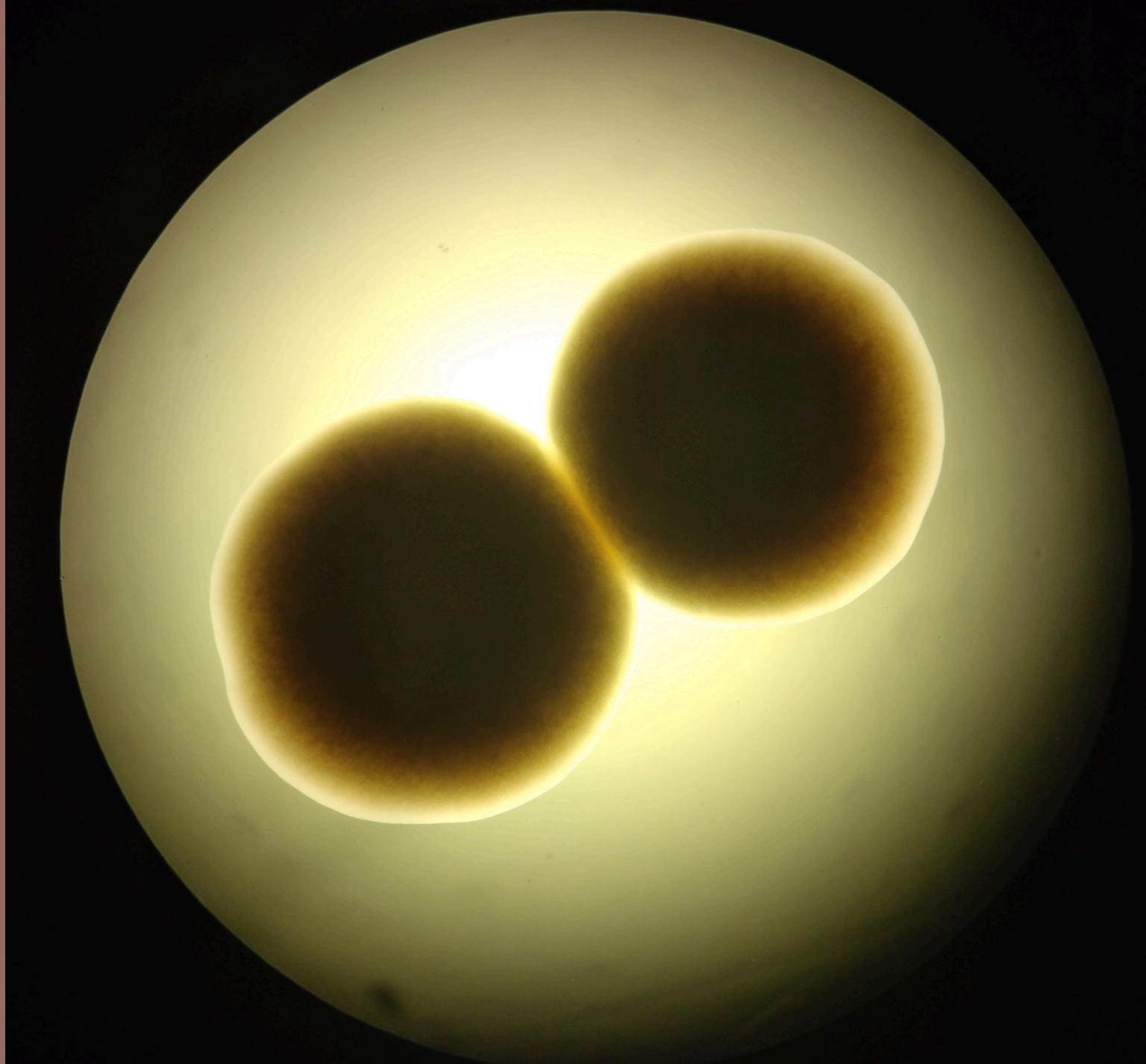
Caracterizar diferentes propiedades probióticas de cepas aisladas de SFN de queserías artesanales nacionales *in vitro*, y evaluar el efecto de la administración crónica de una de ellas en modelos comportamentales de ansiedad y depresión en ratas, incluyendo la caracterización del impacto sobre la comunidad bacteriana de la MI.

# Capítulo 1

## **CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE CEPAS AISLADAS DE SFN**

Objetivos específicos:

- Caracterizar una colección de aislamientos de lactobacilos aisladas de suero fermento naturales de cinco queserías artesanales uruguayas.
- Evaluar su potencial probiótico mediante ensayos *in vitro*.



# Antecedentes

---

Un proyecto de caracterización bioquímica de aislamientos de SFN de queserías artesanales nacionales de San José y Colonia desarrollado en la Facultad de Veterinaria, generó una colección de 101 aislamientos de lactobacilos provenientes de queserías artesanales.

# Diseño experimental



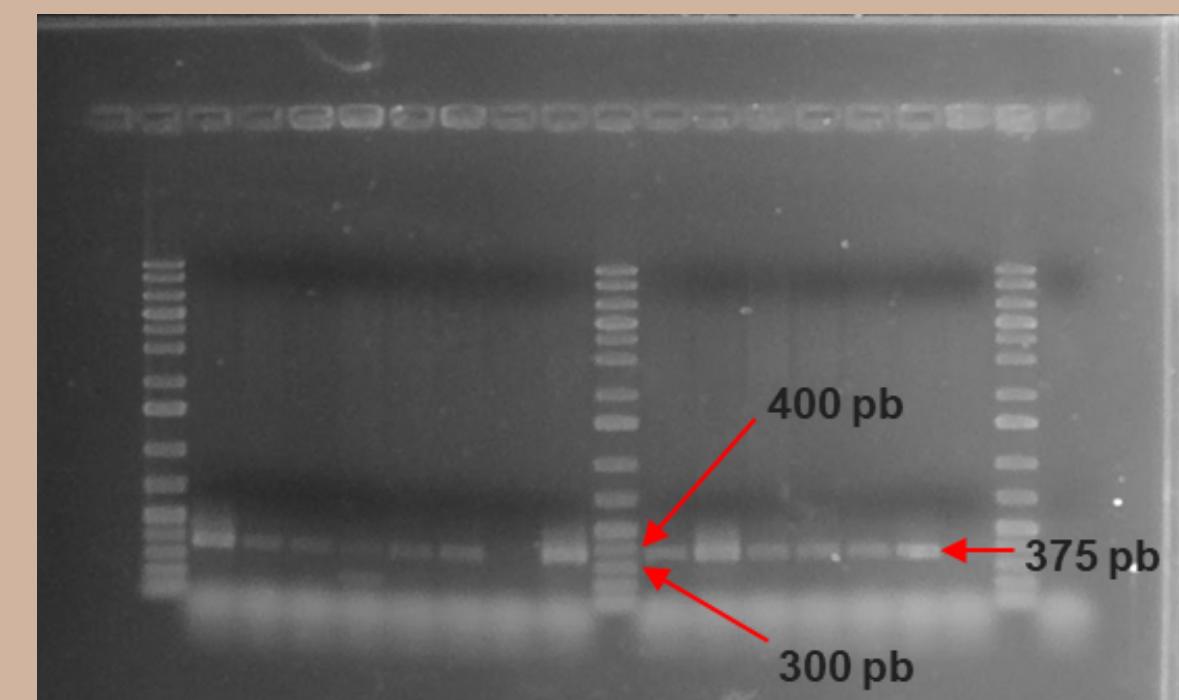
# Presencia del gen *gadB*

**Diseño de primers para amplificar una región del gen de la enzima glutamato descarboxilasa (*gadB*); convierte glutamato a ácido gamma aminobutírico (GABA).**

**Diseño de primers genéricos que amplificaran este gen en diferentes miembros de la familia Lactobacillaceae (375 pb).**

**44 de 101 cepas de (43,3%) contaban con el gen *gadB* (100% de homología con *gadB* de *Lactiplantibacillus plantarum*)**

**Se preseleccionaron 25 de 101 cepas de lactobacilos contaban con el gen *gadB*, de acuerdo a sus condiciones de crecimiento**

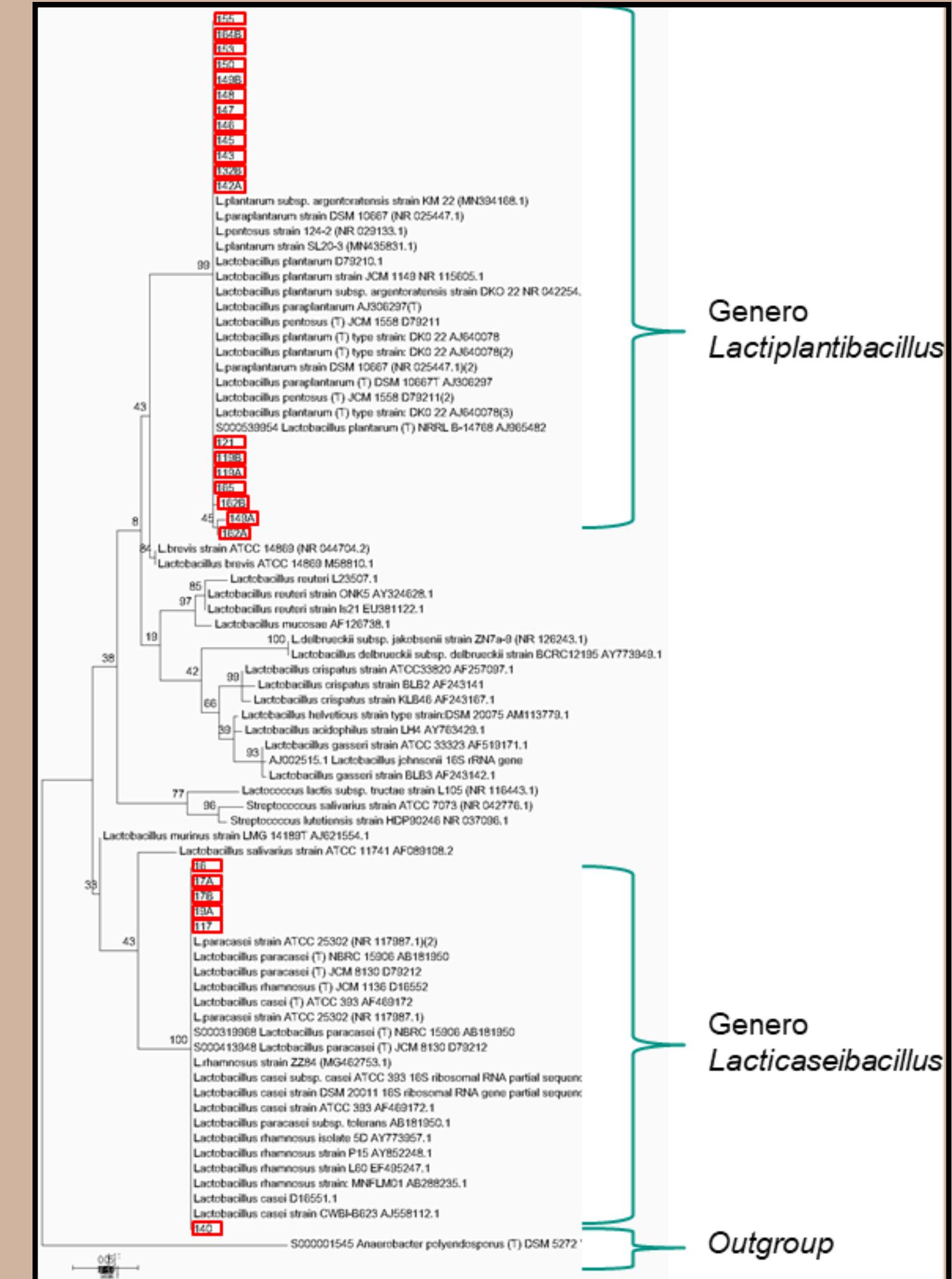


# Identificación taxonómica

# Se amplificó y secuenció el rADN 16S

# Las cepas pertenecen a los géneros:

- **Lactiplantibacillus (19)**
- **Lacticaseibacillus (6).**

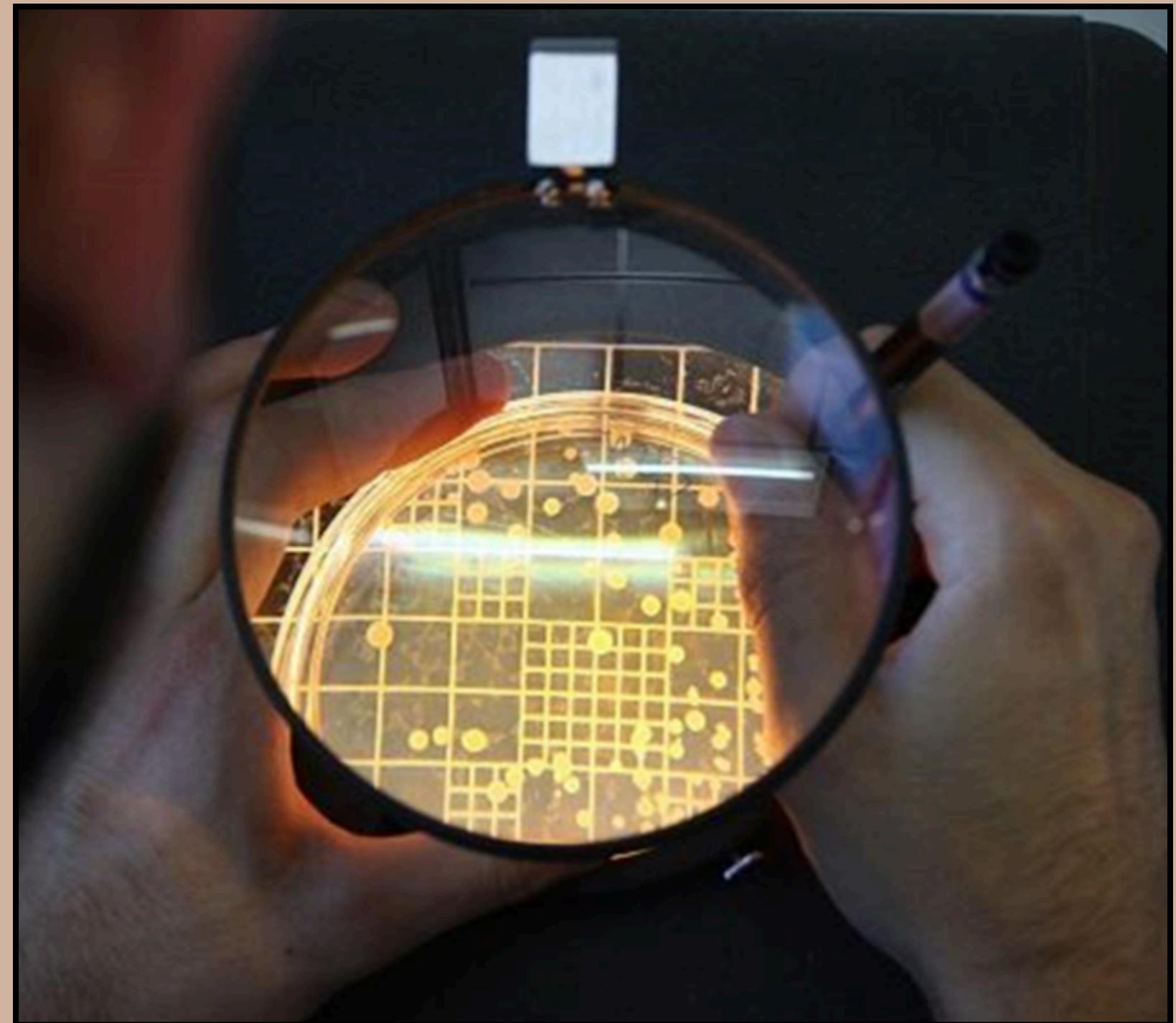


# Resistencia en medios ácidos y presencia de sales biliares

**Se cultivo a las bacterias en medios de cultivo alterados con pH bajos y sales biliares, y se calculó su capacidad de resistencia**

**En general fueron resistentes en medios ácidos**

**La mayoría de las cepas fueron resistentes a las sales biliares, en particular las cepas del género *Lactiplantibacillus***



# Diseño experimental

## Evaluación de capacidad de adhesión a mucus

Sugimura *et al.* 2011  
Owehand *et al.* 1999

## Evaluación de capacidad de formación de biofilms

Lebeer *et al.*, 2008; Stefanovic *et al.*, 2000

## Evaluación de producción de GABA utilizando la técnica de UHPLC-MS

Lozano *et al.*, 2022



Descongelado de aislamientos en medio MRS agar



Suspención bacteriana



1 hora a 37°C en una placa cubierta de mucus intestinal inmovilizado



48 horas a 37°C en medio mTSB

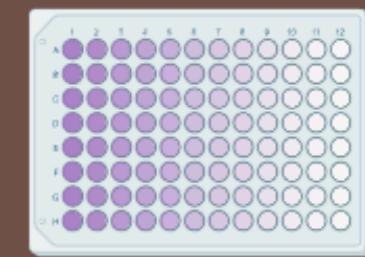


48 horas a 37°C en medio MRS adicionado con ácido glutámico 10mg/ml a pH=5

Extracción de mucus con las bacterias adheridas



Conteo en placa de UFC/ml de bacterias adheridas al mucus



Medición de absorbancia a 590 nm

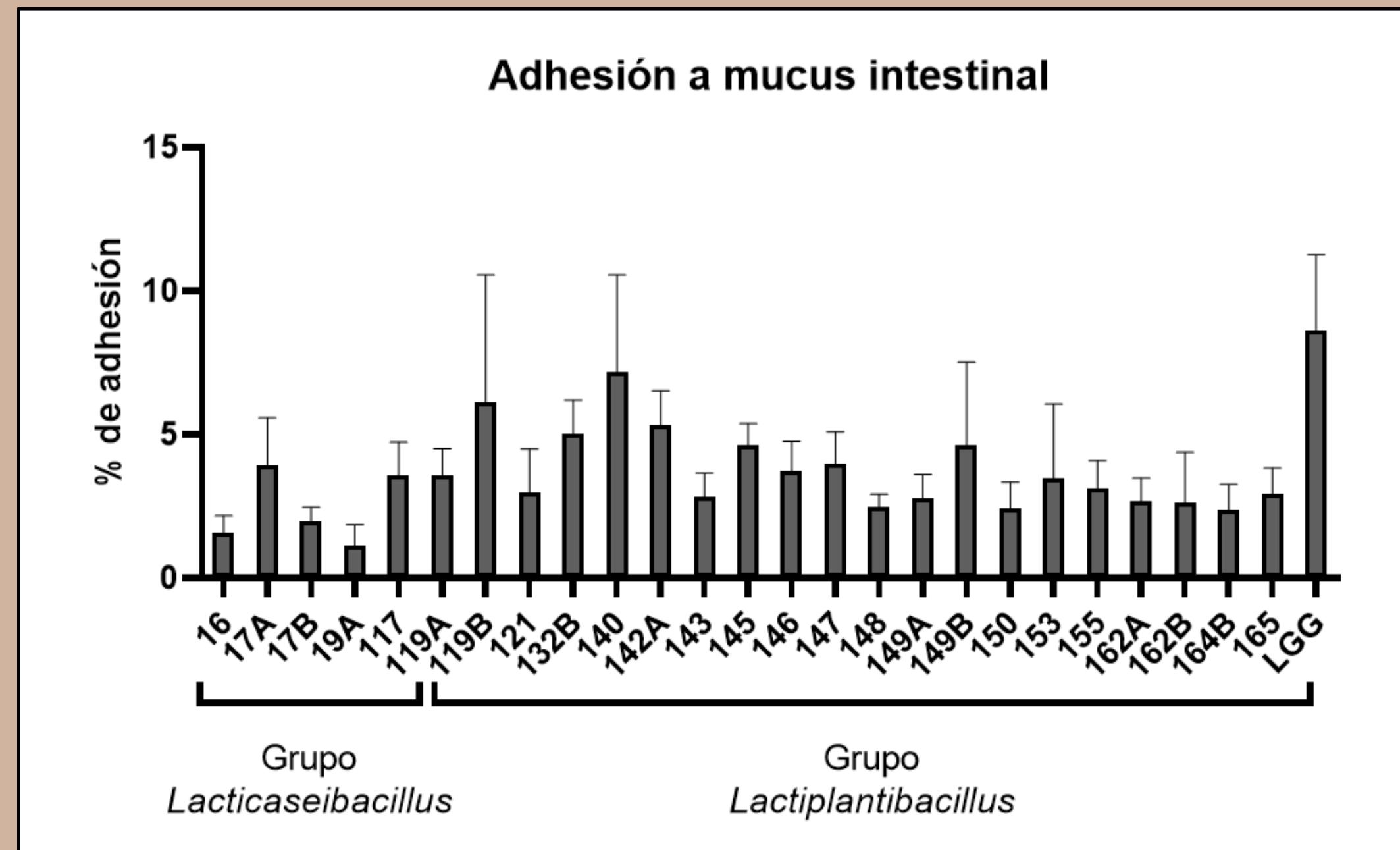


Tinción con cristal violeta

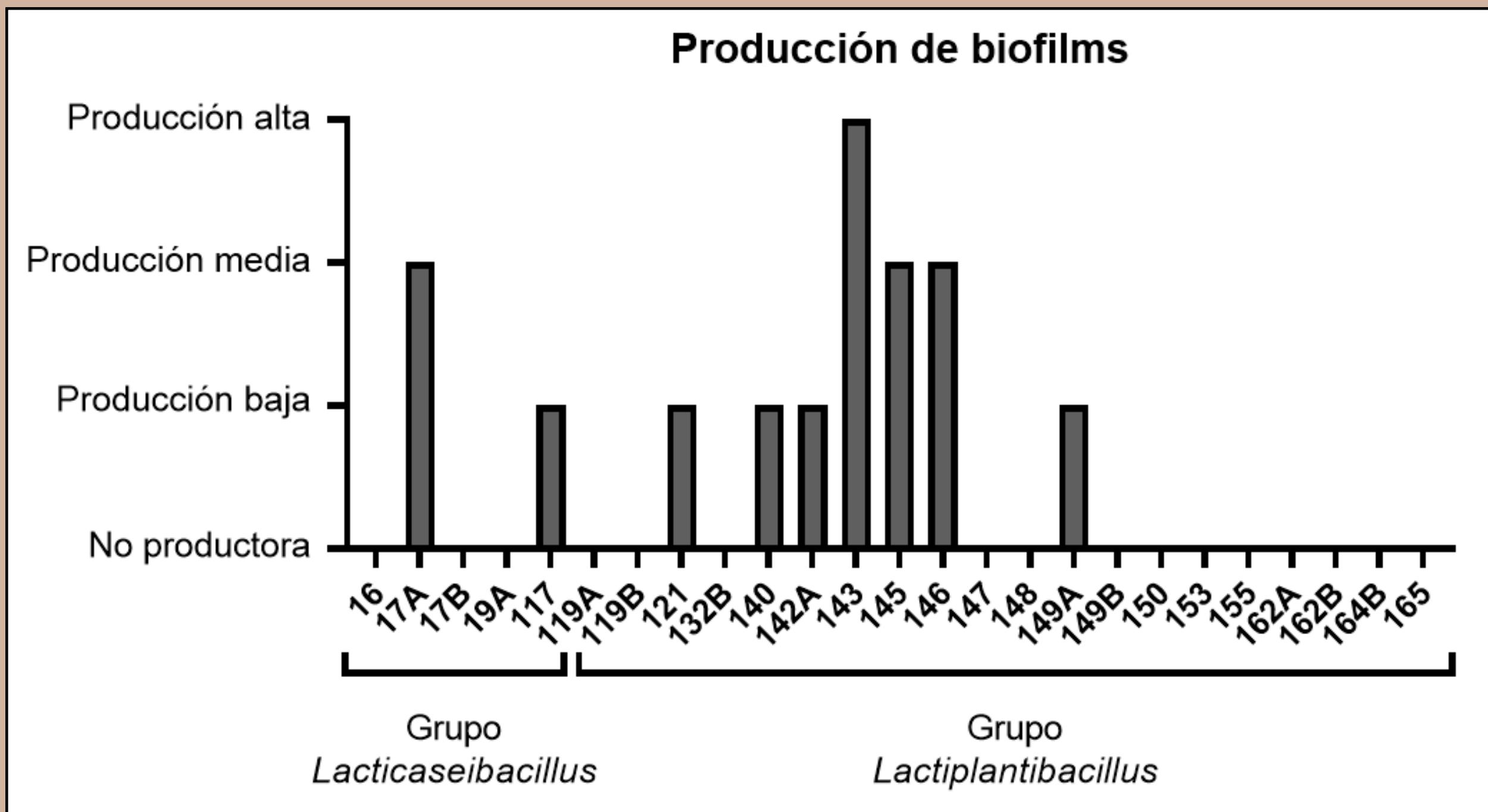
Toma de muestras a las 24 y 48 horas

Medición de GABA en sobrenadante de cultivo bacteriano

# Evaluación de capacidad de adhesión a mucus



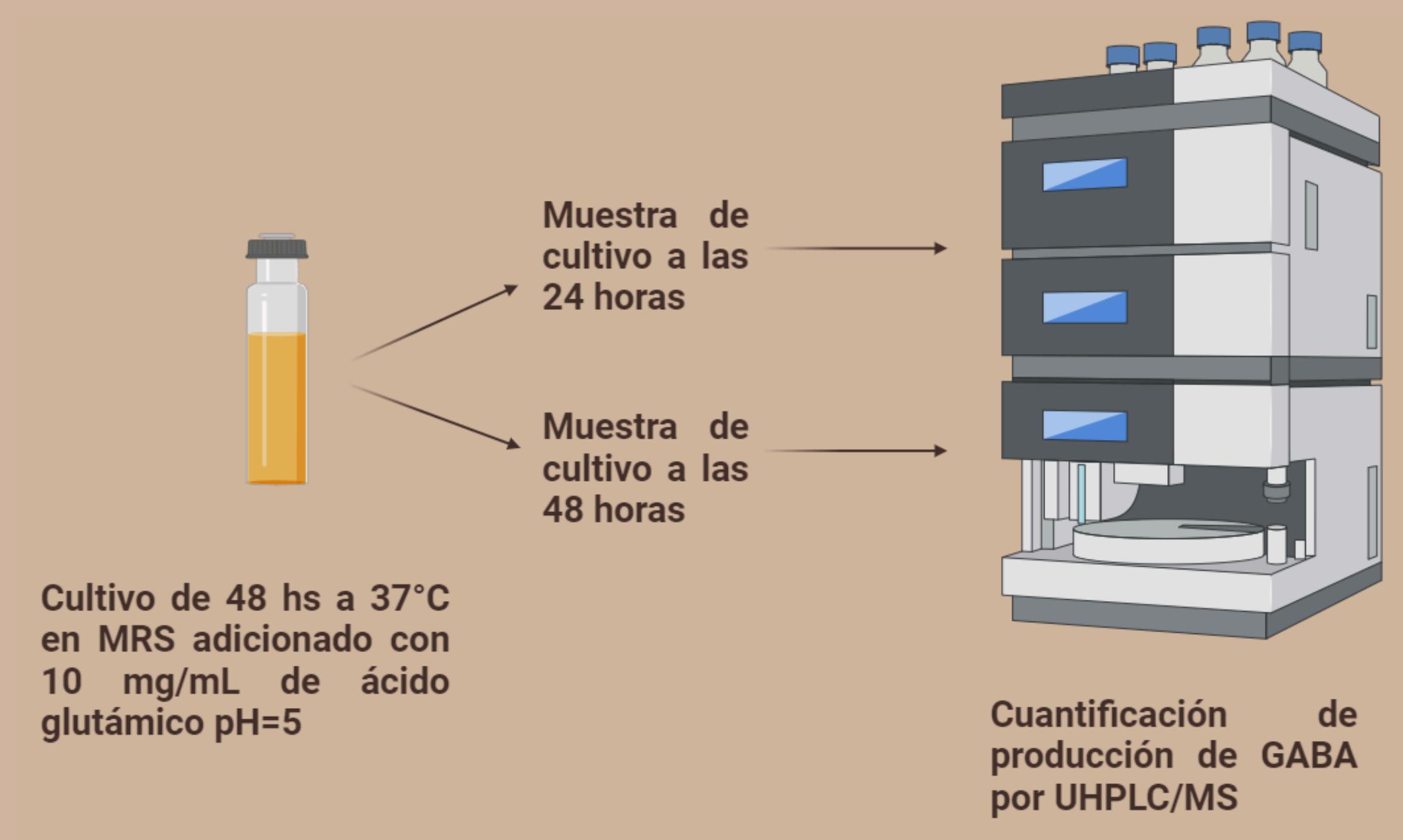
# Evaluación de capacidad de formación de biofilms



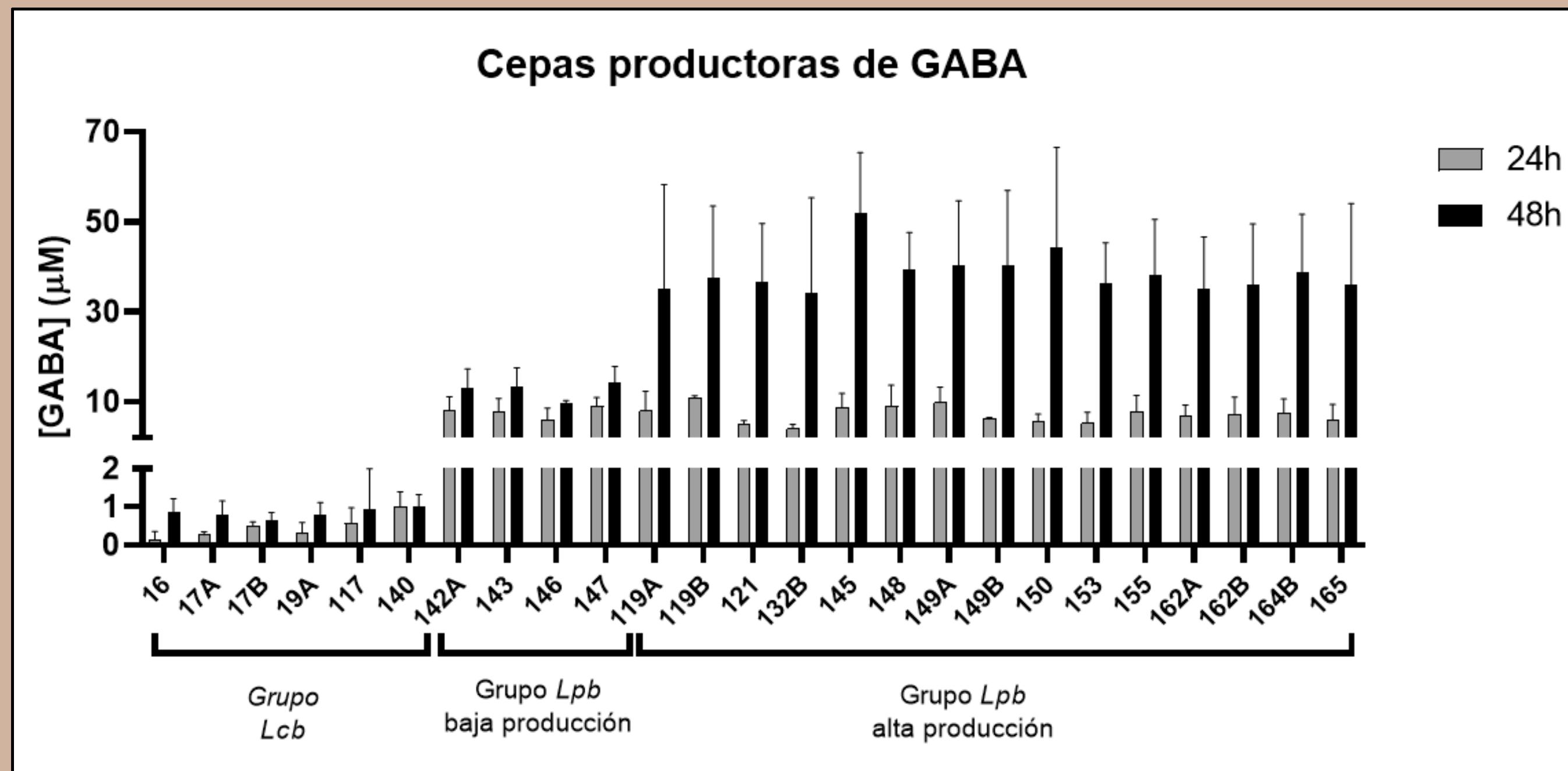
Lebeer et al., 2008

Stefanovic et al., 2000

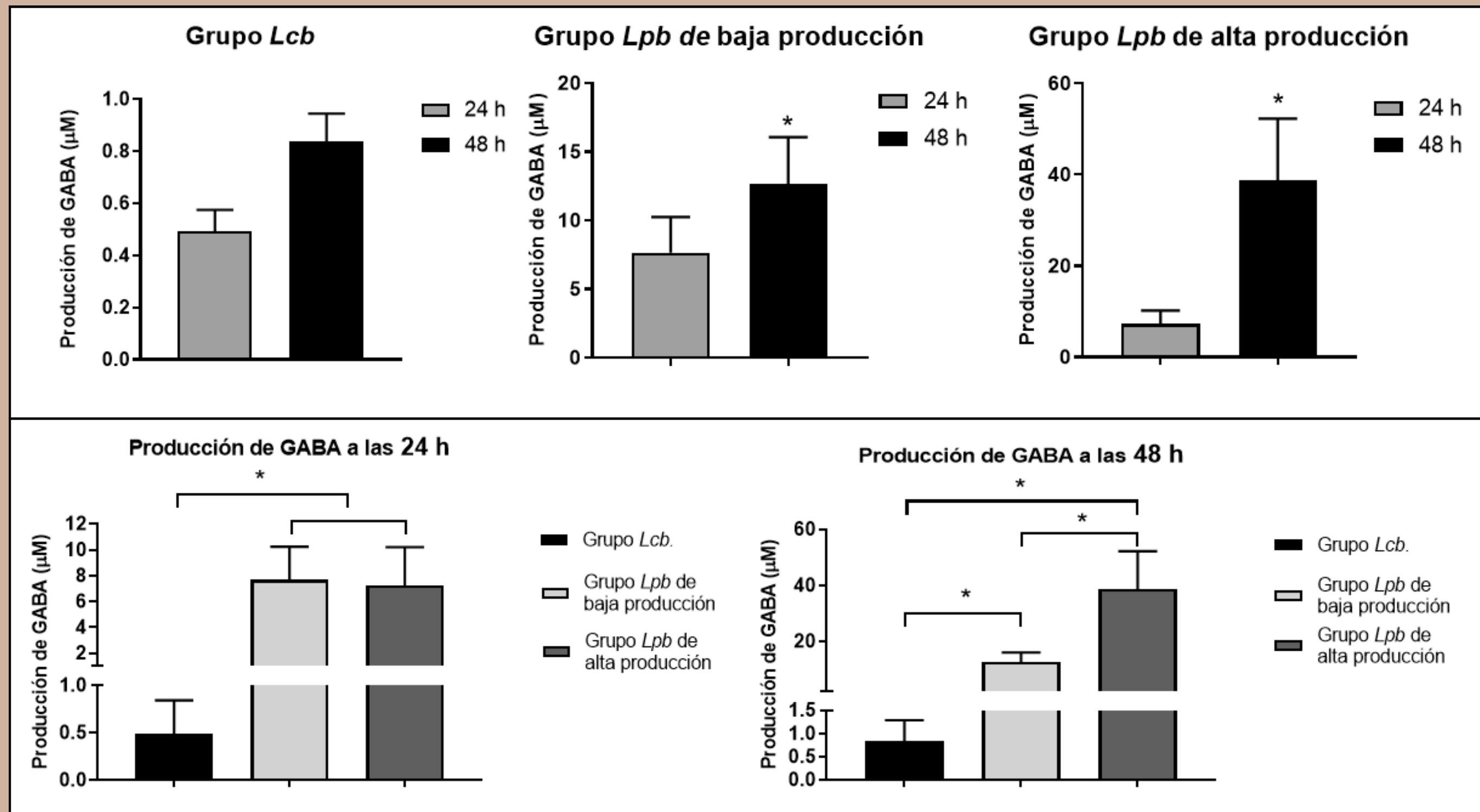
# Cuantificación de la producción de GABA por UHPLC/MS



# Producción de GABA



# Producción de GABA



# Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*

# Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



# Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



Resistencia a medios  
ácidos y sales biliares



Producción  
moderada de biofilms

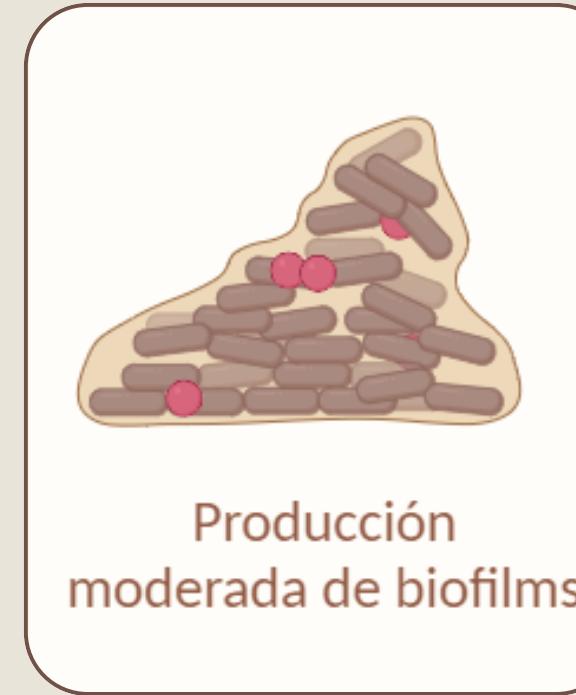
# Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



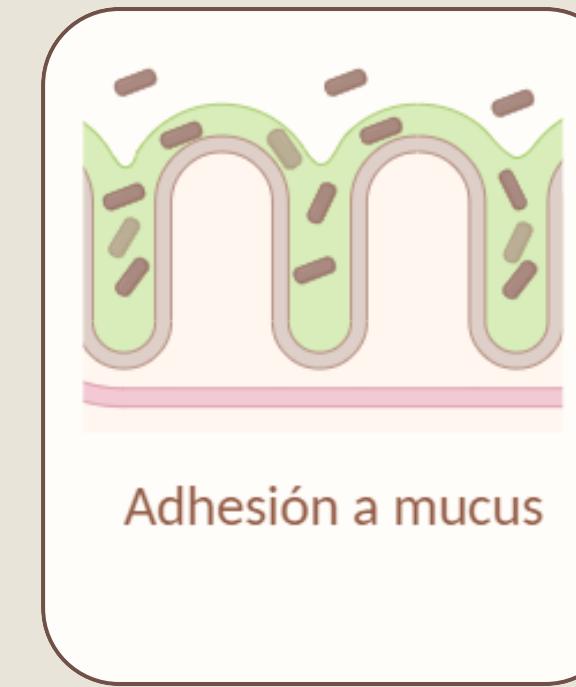
# Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



Resistencia a medios  
ácidos y sales biliares



Producción  
moderada de biofilms



Adhesión a mucus



Alta producción de  
GABA

# Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



Résistencia a medios  
ácidos y sales biliares



Producción  
moderada de biofilms



Adhesión a mucus



Alta producción de  
GABA

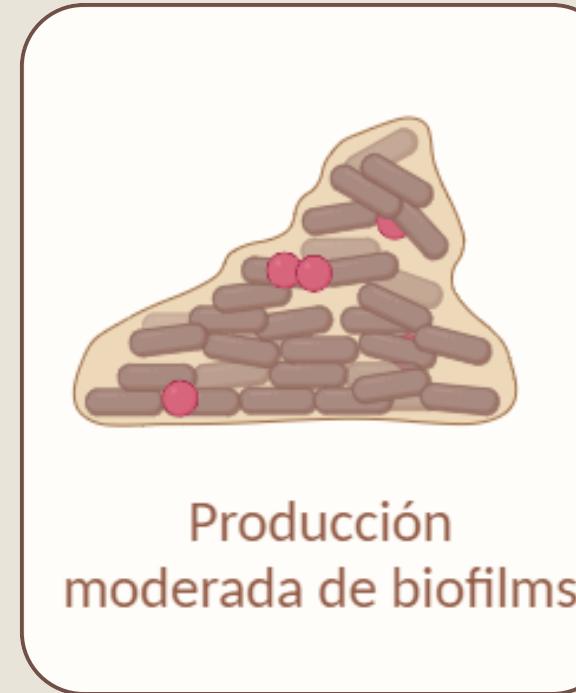


Liofilización y  
almacenamiento a  
-80°C por 45 días

# Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



Résistencia a medios  
ácidos y sales biliares



Producción  
moderada de biofilms



Adhesión a mucus



Alta producción de  
GABA



Liofilización y  
almacenamiento a  
-80°C por 45 días

Candidata Principal.... Cepa 145

# Discusión

El porcentaje de adhesión fue bajo en comparación a otros trabajos (Fernández *et al.*, 2018).

Se vio una producción relativamente baja de biofilms entre todas las cepas, con unas pocas excepciones.

Los aislamientos del género Lpb mostraron una producción de GABA significativamente mayor que los aislamientos del género Lcb. con un máximo de producción de la cepa 145 (Shan *et al.*, 2015).

Se seleccionó la cepa LPB145 debido a sus características *in vitro* para sobrevivir el pasaje por el TGI, además de su gran capacidad de producción de GABA

# Discusión

El porcentaje de adhesión fue bajo en comparación a otros trabajos (Fernández *et al.*, 2018).

Se vio una producción relativamente baja de biofilms entre todas las cepas, con unas pocas excepciones.

Los aislamientos del género Lpb mostraron una producción de GABA significativamente mayor que los aislamientos del género L. (Shan *et al.*, 2015).

Se seleccionó la cepa LPB145 debido por el TGI, además de su gran capaci

ORIGINAL ARTICLE

Journal of Applied Microbiology 

**Probiotic potential of GABA-producing lactobacilli isolated from Uruguayan artisanal cheese starter cultures**

Joaquin Lozano<sup>1</sup>  | Sofia Fernández-Ciganda<sup>1,2</sup> | Álvaro González Revollo<sup>3</sup> |  
Dario Hirigoyen<sup>3</sup> | Marcela Martínez<sup>4</sup> | Cecilia Scorza<sup>5</sup> | Pablo Zunino<sup>1</sup>

# Capítulo 2

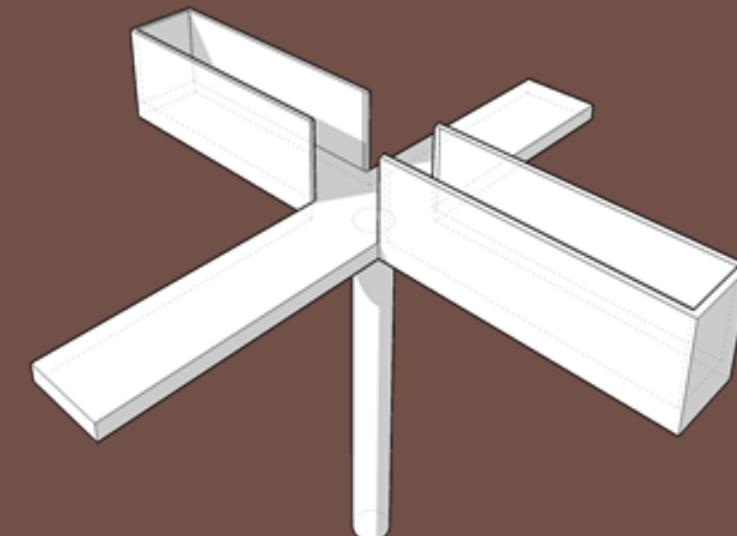
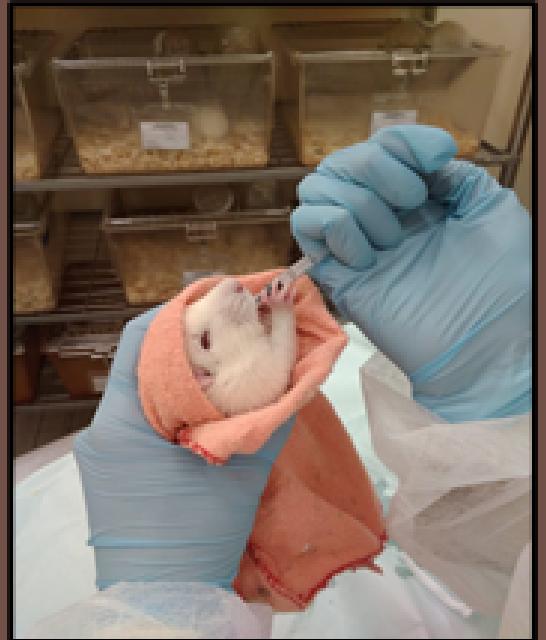
## **CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE LA CEPA LPB145 COMO MODULADOR DEL EJE MIC EN RATAS**

Objetivos específicos:

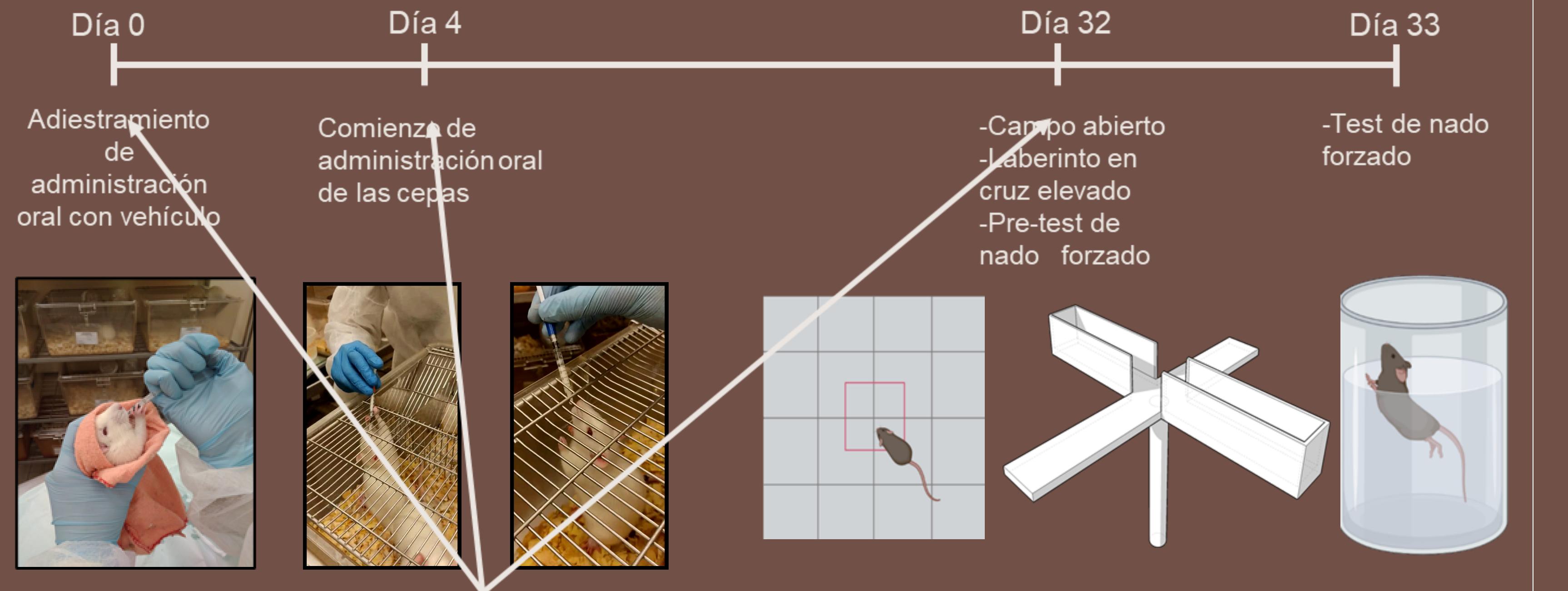
- Caracterizar los efectos comportamentales en ratas inducidos por la administración crónica de una cepa del género *Lactiplantibacillus* potencialmente probiótica y productora de GABA.
- Estudiar el impacto de este tratamiento en la estructura y diversidad de la microbiota intestinal



# Diseño experimental



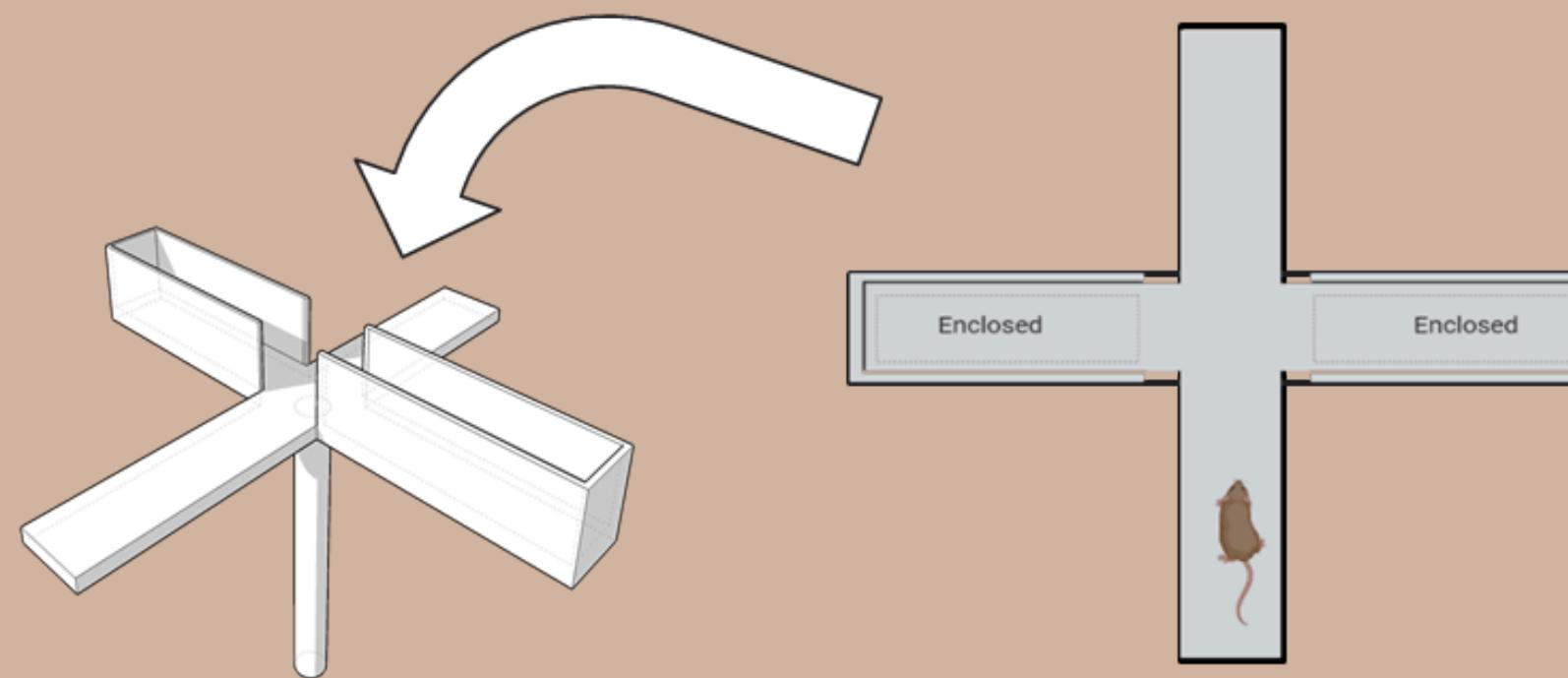
# Diseño experimental



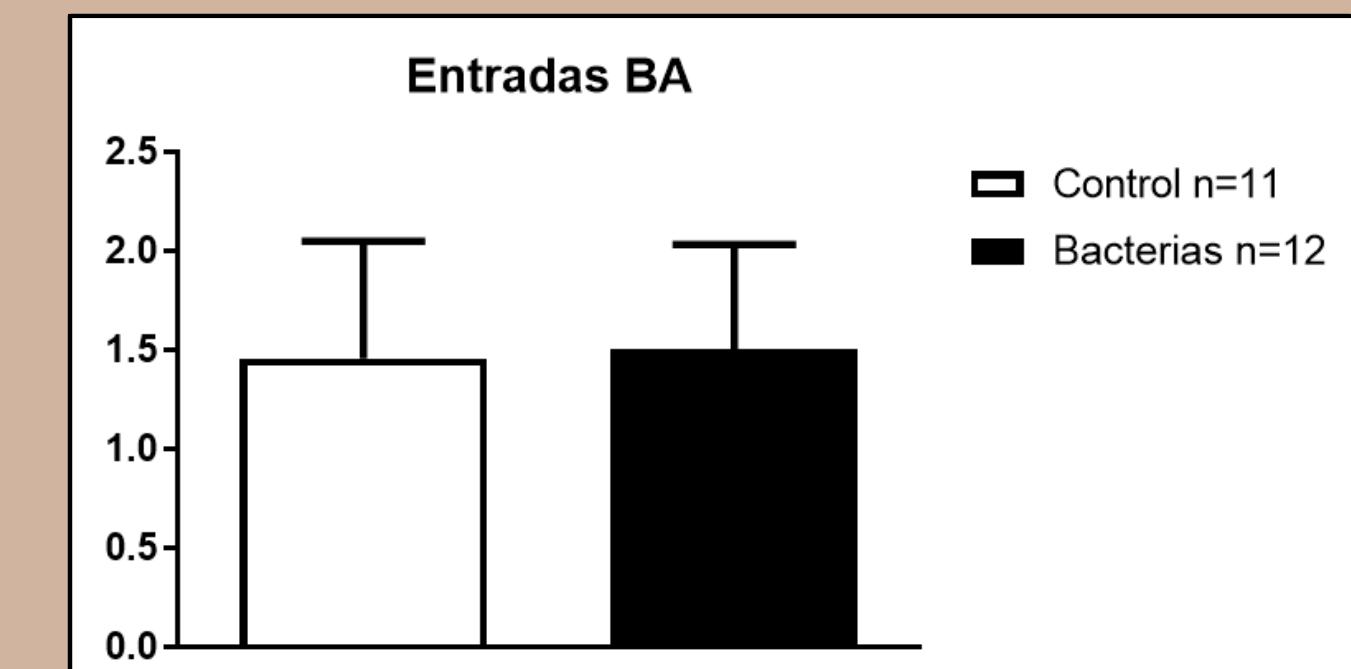
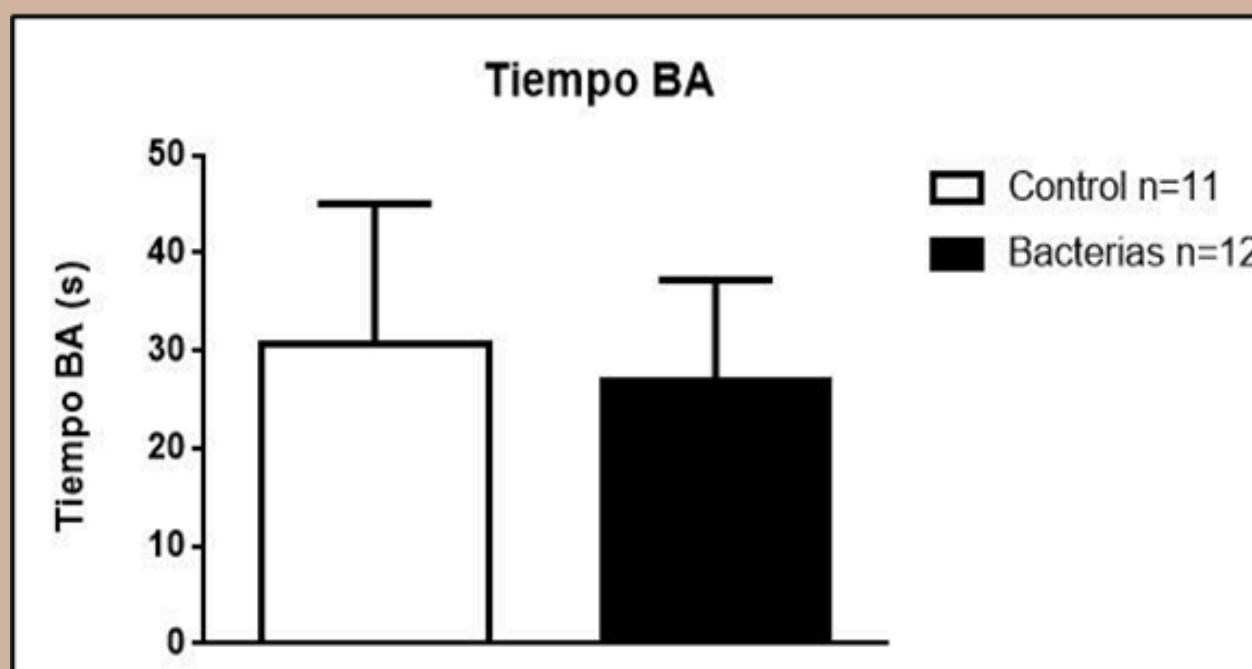
Extracción ADN fecal para análisis de la microbiota intestinal por secuenciación del ADNr 16S

# Resultados comportamentales

# Laberinto en cruz elevado



Modelo de evaluación de  
efectos tipo-ansiolíticos  
o ansiogénico en  
tratamientos con  
fármacos.

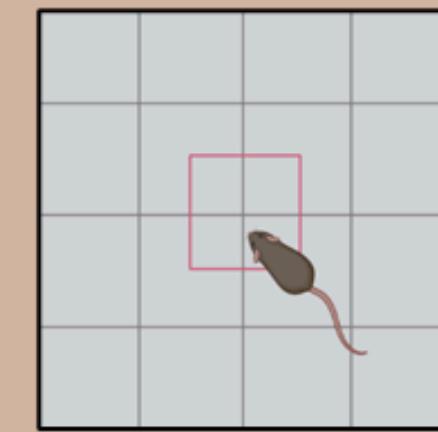
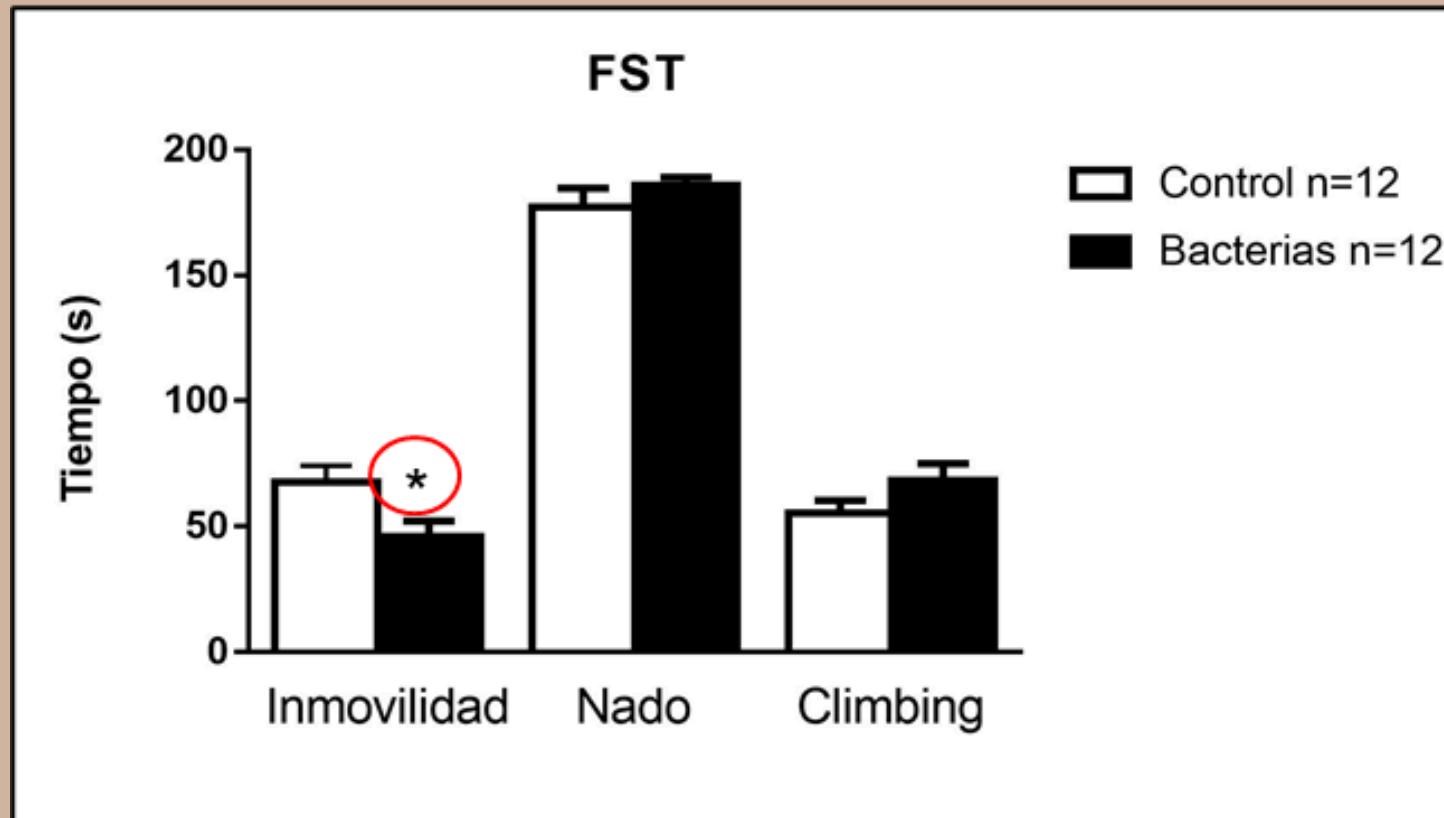


# Test de nado forzado



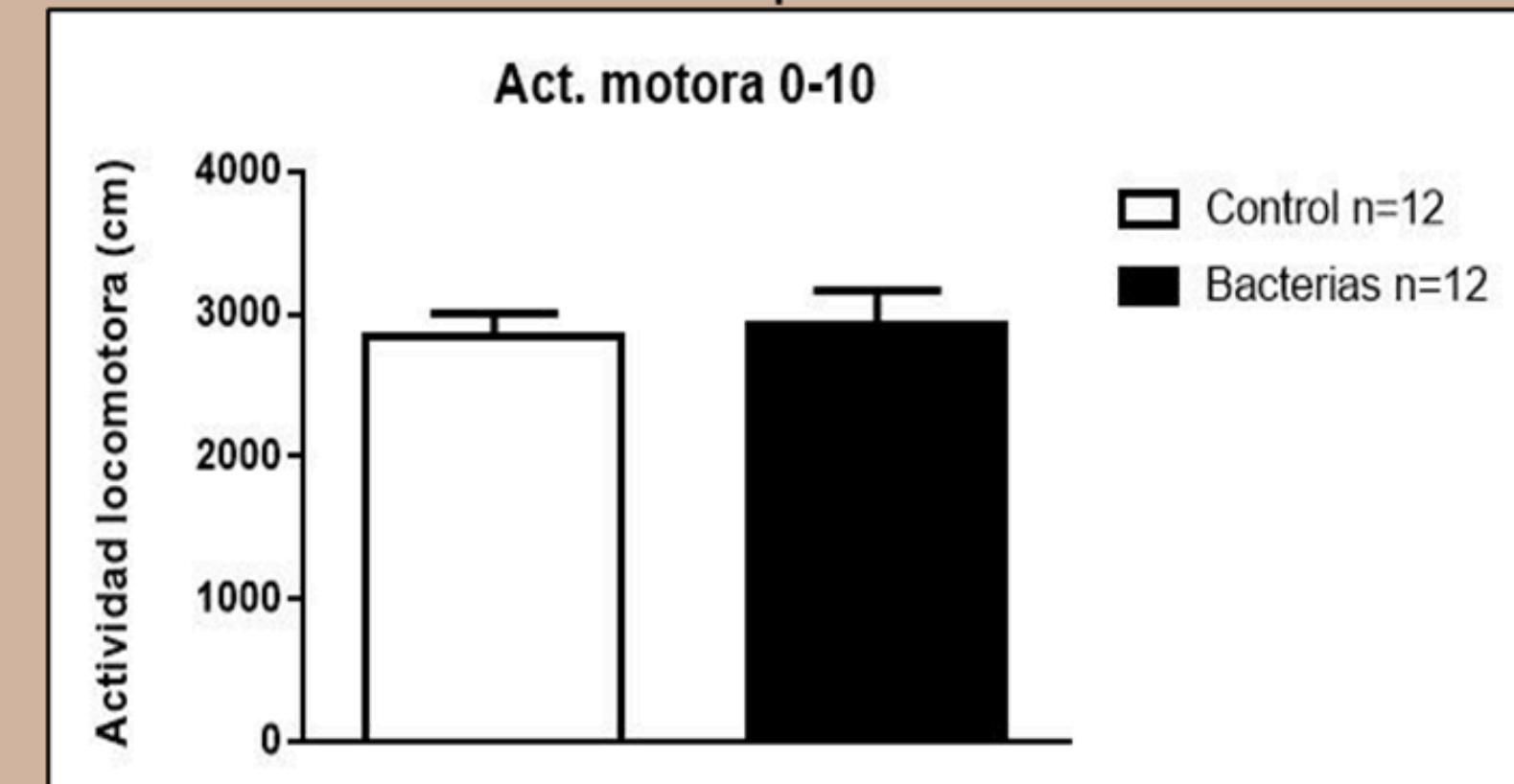
Modelo de evaluación  
de efectos tipo-  
antidepresivo en  
tratamientos con  
fármacos

Test de nado forzado



Modelo de evaluación  
de efectos en la  
locomoción frente a  
tratamientos con  
fármacos

Test de campo abierto



# Discusión

No se observaron efectos sobre los comportamientos asociados a un efecto tipo-ansiolítico del tratamiento.

No se descarta un posible efecto tipo-ansiolítico del tratamiento con LPB145 en otros modelos de ansiedad experimental (Huang *et al.*, 2022)

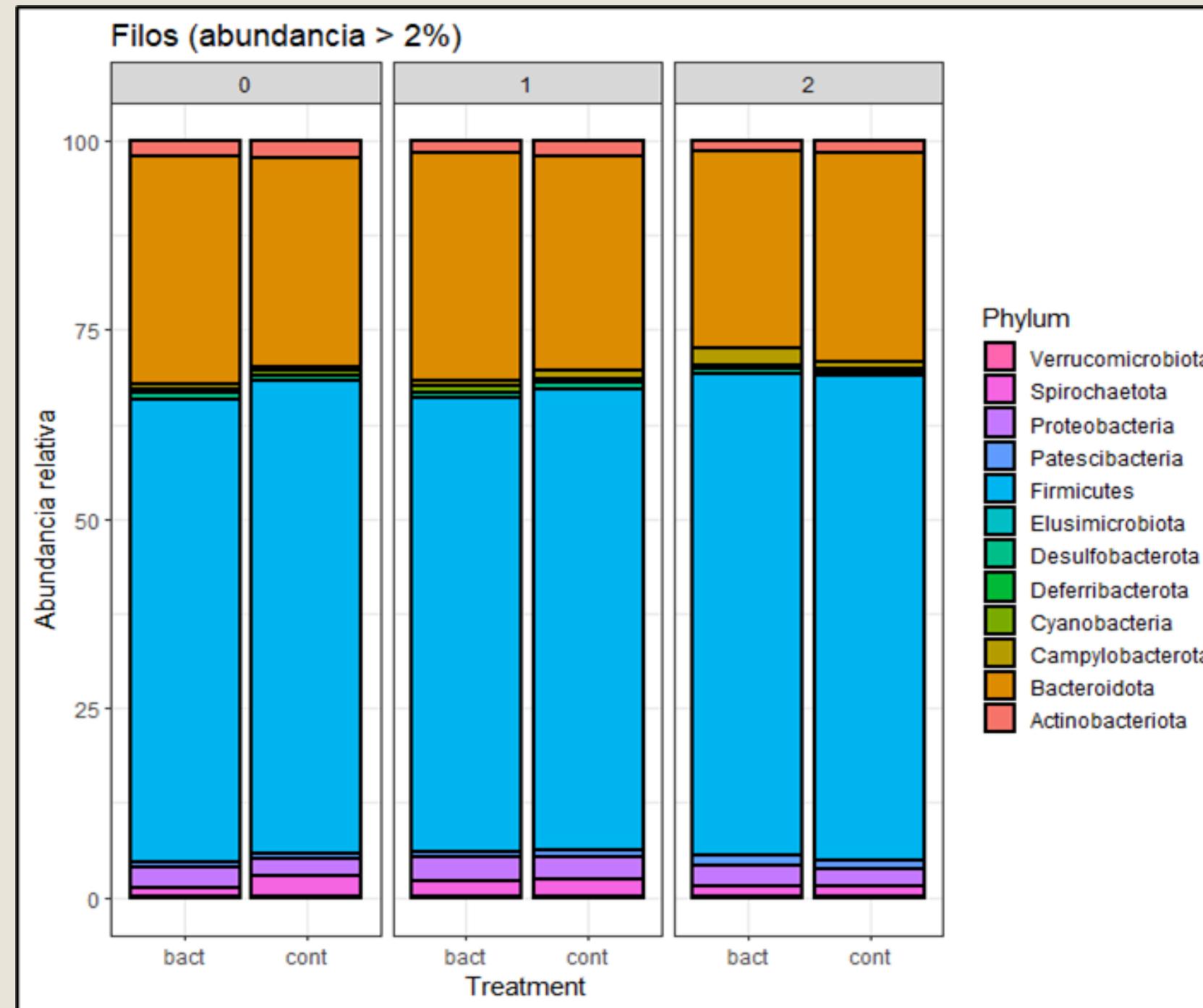
El consumo de la cepa LPB145 redujo significativamente la inmovilidad en el test de nado forzado. Lo cual se asocia a un efecto tipo-antidepresivo (Yunes *et al.*, 2020)

Fue validado por el test de campo abierto que los resultados anteriores no se deben a cambios en la actividad locomotora.

Por lo tanto, el efecto de tipo antidepresivo observado en el TNF es probablemente específico y no está relacionado con la estimulación de la actividad motora general.

# Análisis de la microbiota intestinal

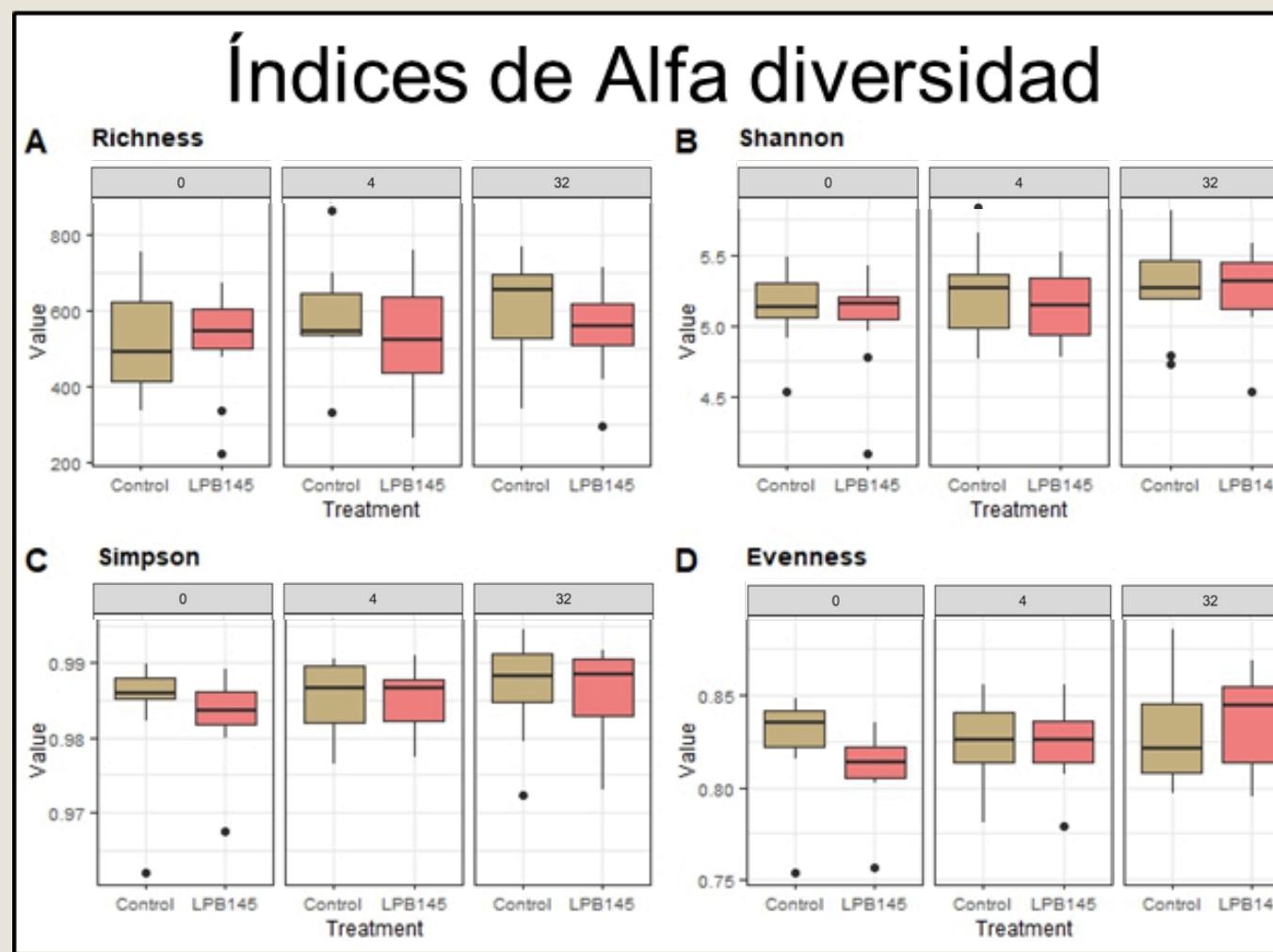
# Análisis de la MI de los animales de experimentación



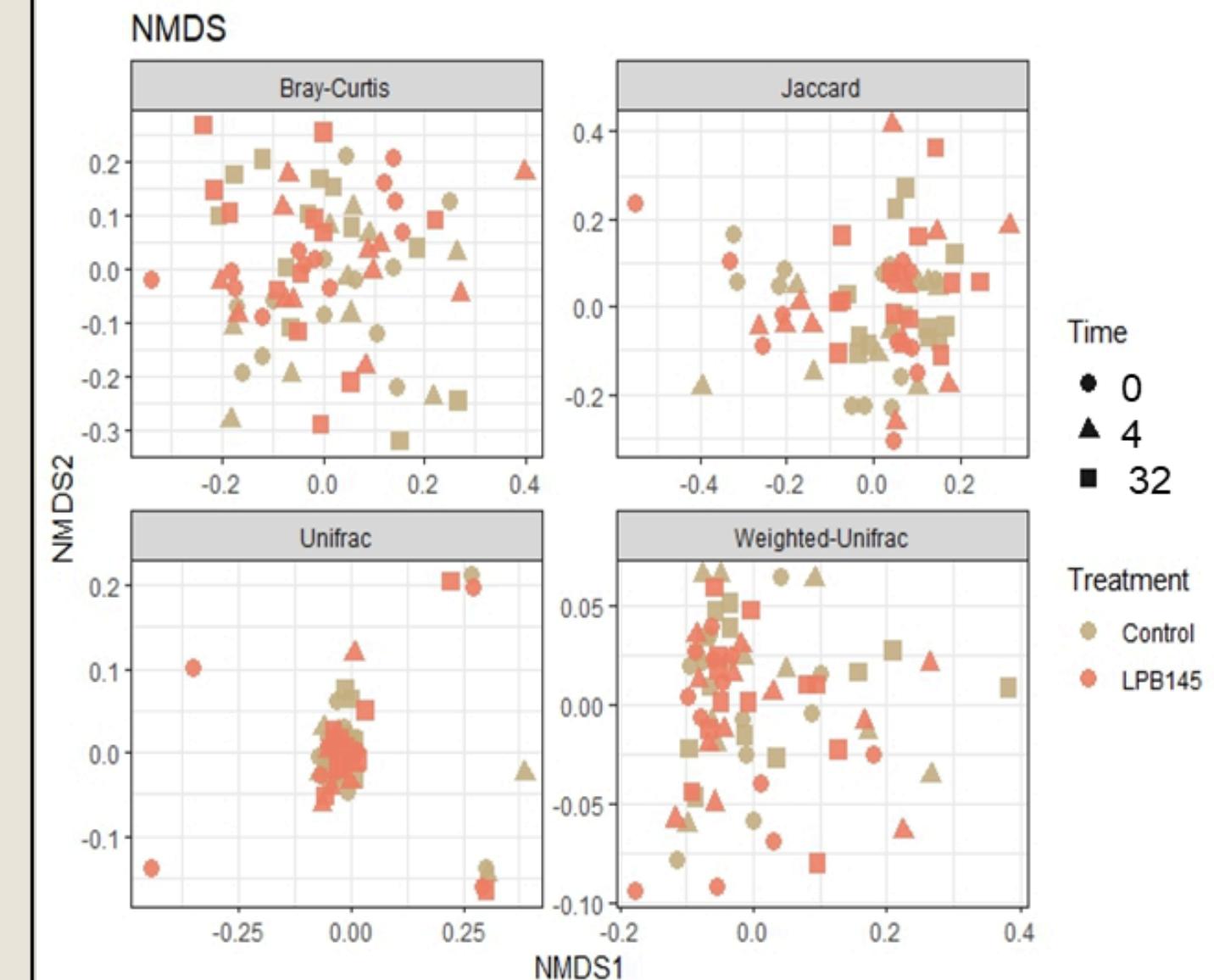
No se observaron cambios significativos en las poblaciones bacterianas a nivel de filo entre tratamientos.

# Análisis de la MI de los animales de experimentación

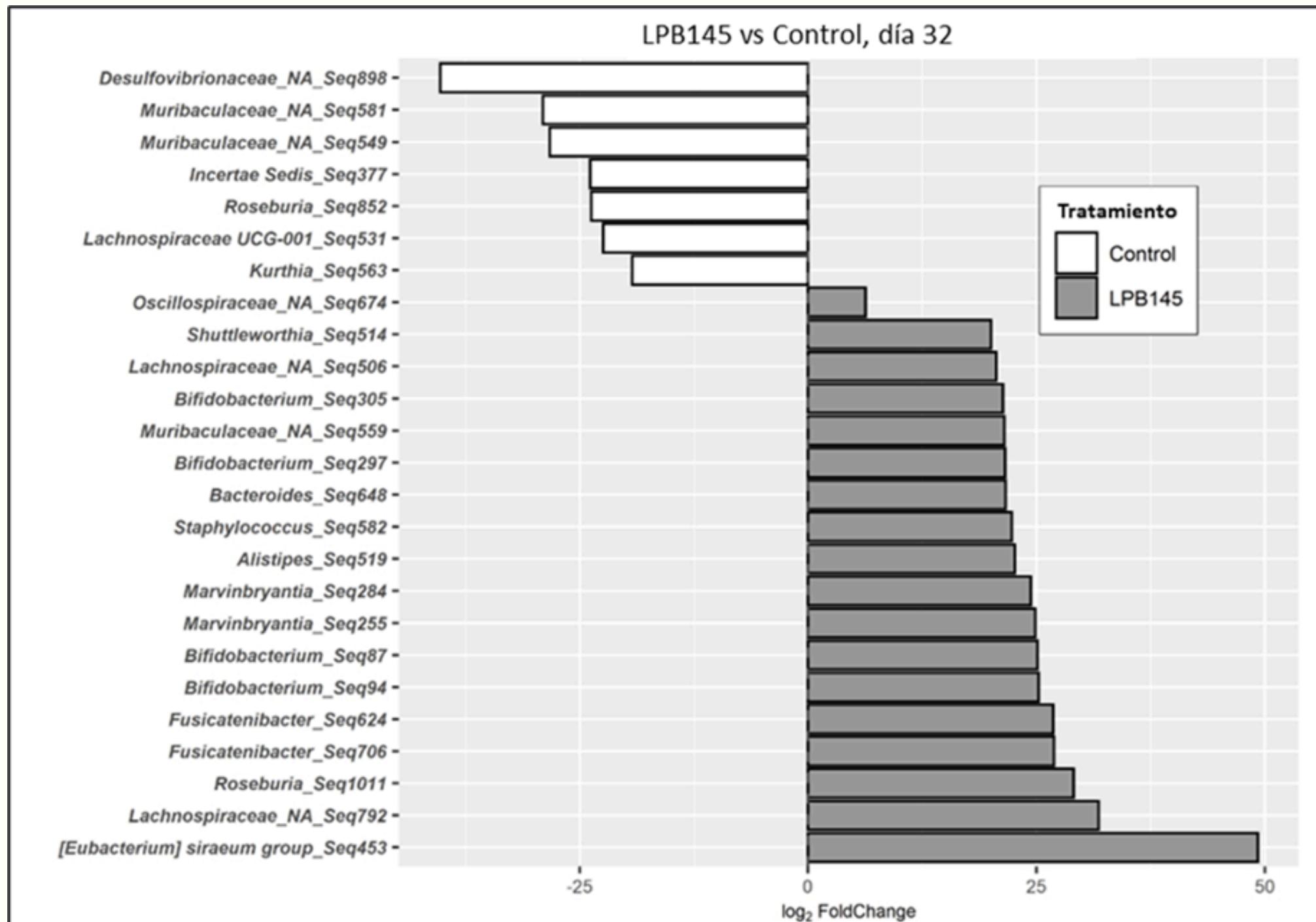
No hubo cambios en la diversidad alfa o distribución de las poblaciones bacterianas entre el grupo tratado y el grupo control.



Análisis multivariado por Escalamiento multidimensional no métrico NMDS

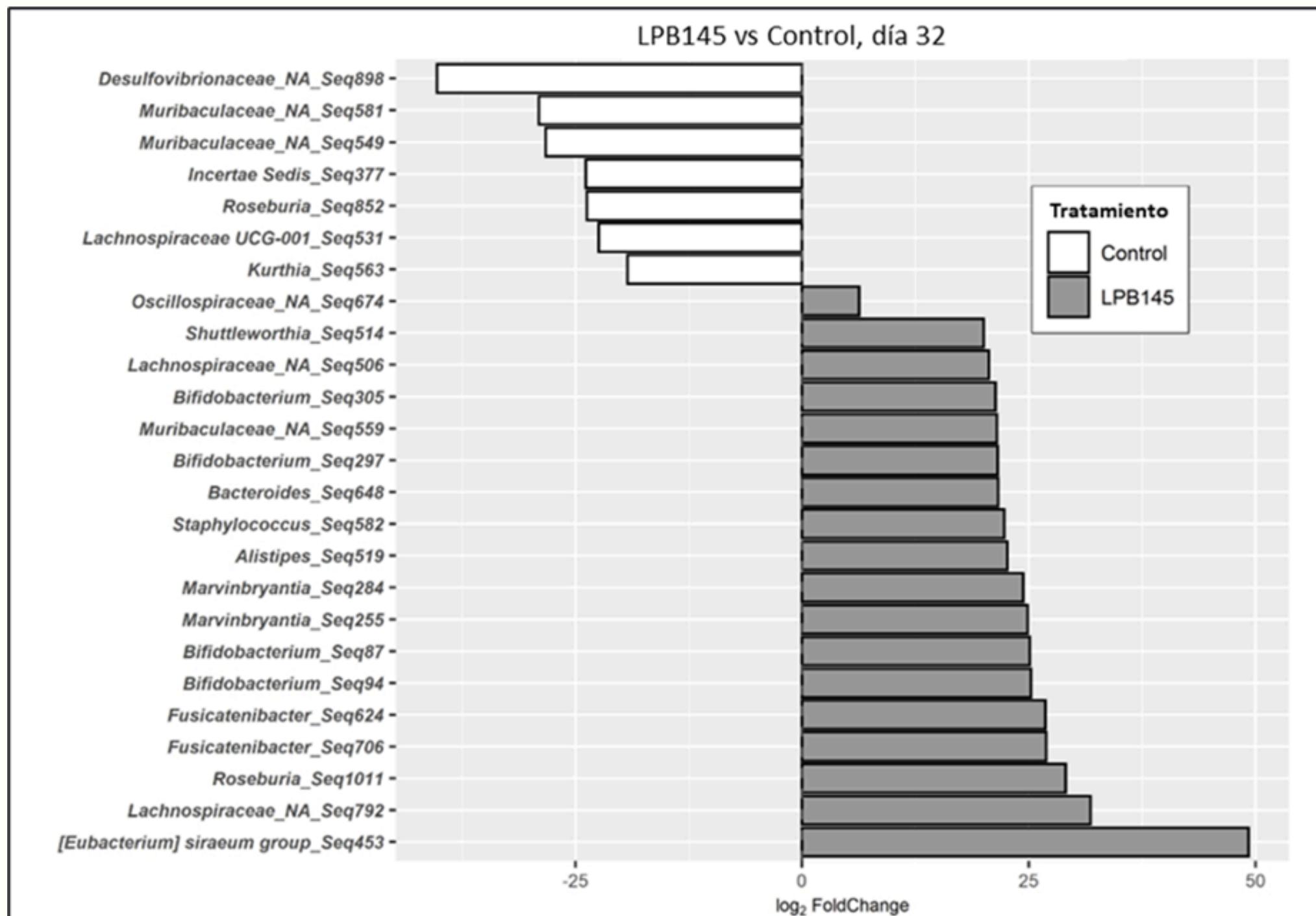


# Cambios en la abundancia relativa de taxones



A través de un análisis diferencial de presencia de taxones (DESeq2) se analizaron cambios en las abundancias relativas de distintos taxones entre el grupo control y el tratado.

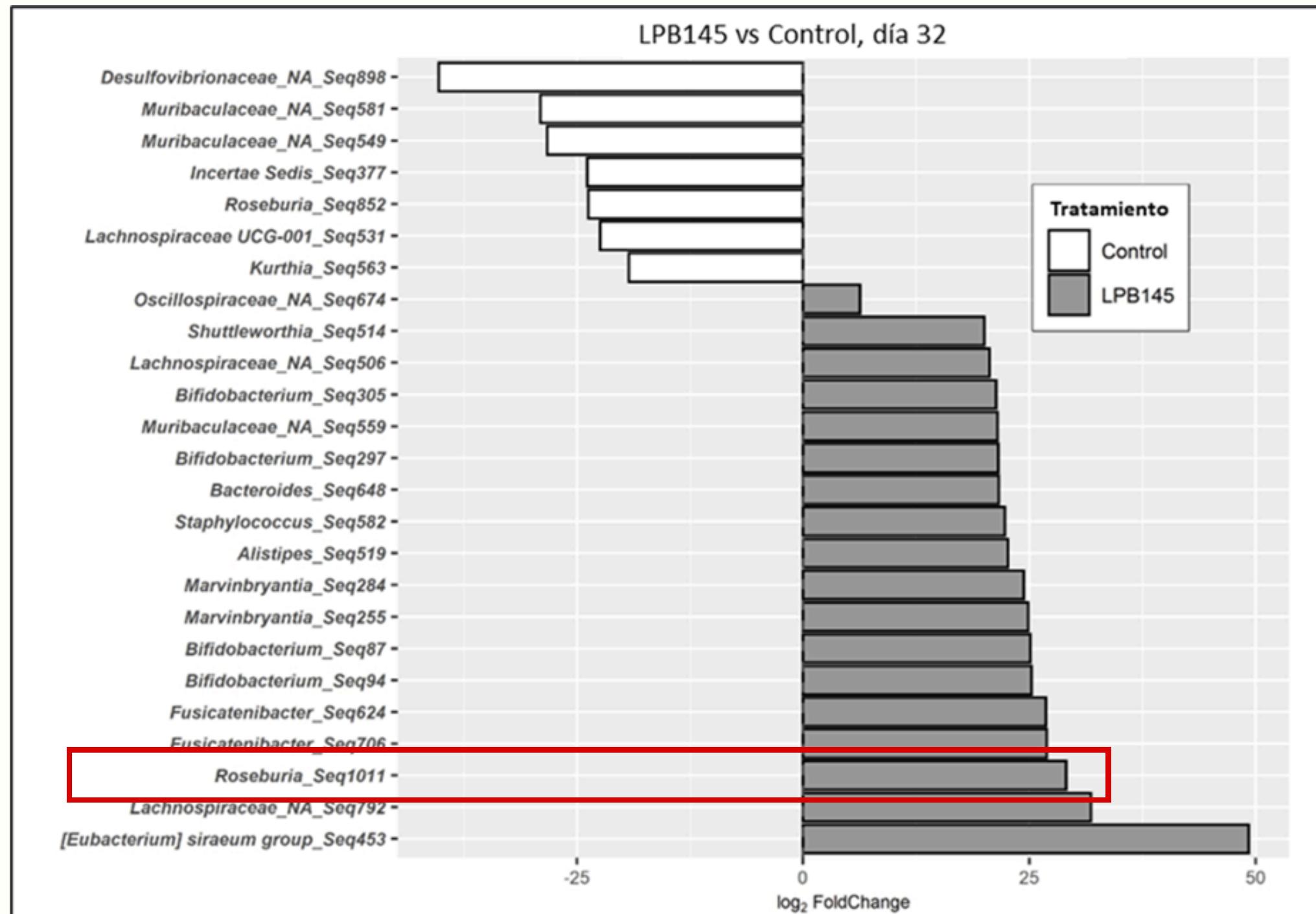
# Cambios en la abundancia relativa de taxones



Se observó un aumento en varios taxones de bacterias similares filogenéticamente a bacterias potencialmente beneficiosas, como:

- *Roseburia*
- *Fusicatenibacter*
- *Bifidobacterium*
- *Alistipes*

# Cambios en la abundancia relativa de taxones



Se observó un aumento en varios taxones de bacterias similares filogenéticamente a bacterias potencialmente beneficiosas, como:

- *Roseburia*
- *Fusicatenibacter*
- *Bifidobacterium*
- *Alistipes*

# Cambios en la abundancia relativa de taxones

 Therapeutic Advances in Gastroenterology

Original Research

**New pathway ameliorating ulcerative colitis: focus on *Roseburia intestinalis* and the gut-brain axis**

Ther Adv Gastroenterol  
2021, Vol. 14: 1-14  
DOI: 10.1177/  
17562848211004469  
© The Author(s), 2021.  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-  
permissions

Fenghua Xu, Yi Cheng, Guangcong Ruan, Liqin Fan, Yuting Tian, Zhifeng Xiao,  
Dongfeng Chen and Yanling Wei 

 **biomedicines**

Article

**Alterations of the Composition and Neurometabolic Profile of Human Gut Microbiota in Major Depressive Disorder**

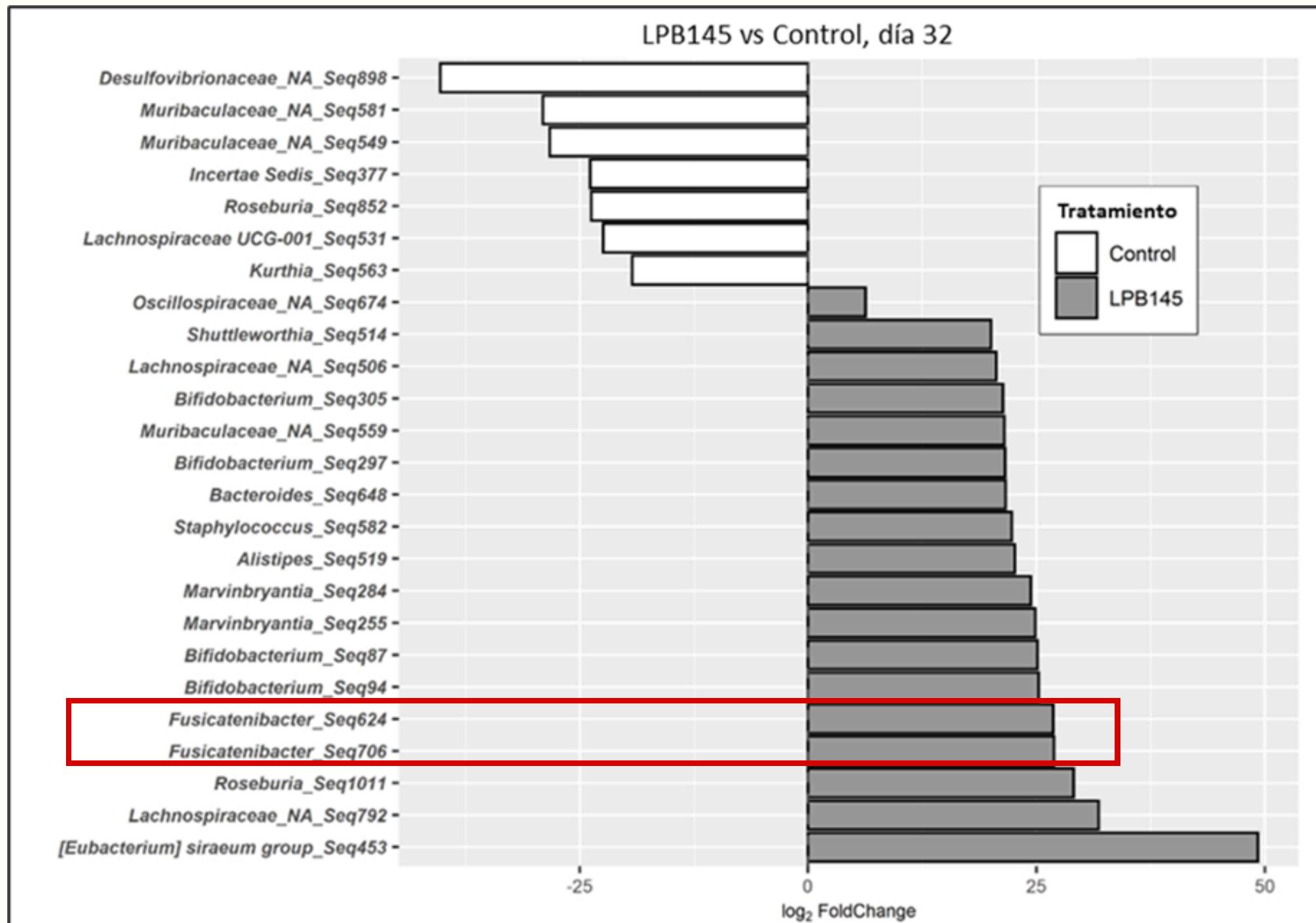
Alexey S. Kovtun <sup>1,2,\*</sup> , Olga V. Averina <sup>1</sup>, Irina Y. Angelova <sup>1,3</sup>, Roman A. Yunes <sup>1</sup> , Yana A. Zorkina <sup>1,4,5</sup> , Anna Y. Morozova <sup>4,5</sup>, Alexey V. Pavlichenko <sup>4</sup> , Timur S. Syunyakov <sup>4</sup> , Olga A. Karpenko <sup>4</sup>, George P. Kostyuk <sup>4,6</sup>  and Valery N. Danilenko <sup>1,7</sup>

log<sub>2</sub> foldChange

Se observó un aumento en varios taxones de bacterias similares filogenéticamente a bacterias potencialmente beneficiosas, como:

- *Roseburia*
- *Fusicatenibacter*
- *Bifidobacterium*
- *Alistipes*

# Cambios en la abundancia relativa de taxones



Se observó un aumento en varios taxones de bacterias similares filogenéticamente a bacterias potencialmente beneficiosas, como:

- *Roseburia*
- *Fusicatenibacter*
- *Bifidobacterium*
- *Alistipes*

# Cambios en la abundancia relativa de taxones

frontiers  
in Psychiatry

ORIGINAL RESEARCH  
published: 13 September 2021  
doi: 10.3389/fpsy.2021.651536



**Gut Microbiome: A Potential Indicator for Differential Diagnosis of Major Depressive Disorder and General Anxiety Disorder**

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2013), **63**, 3691–3696 DOI 10.1099/ijss.0.045823-0

*Fusicatenibacter saccharivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces

Toshihiko Takada, Takashi Kurakawa, Hirokazu Tsuji and Koji Nomoto

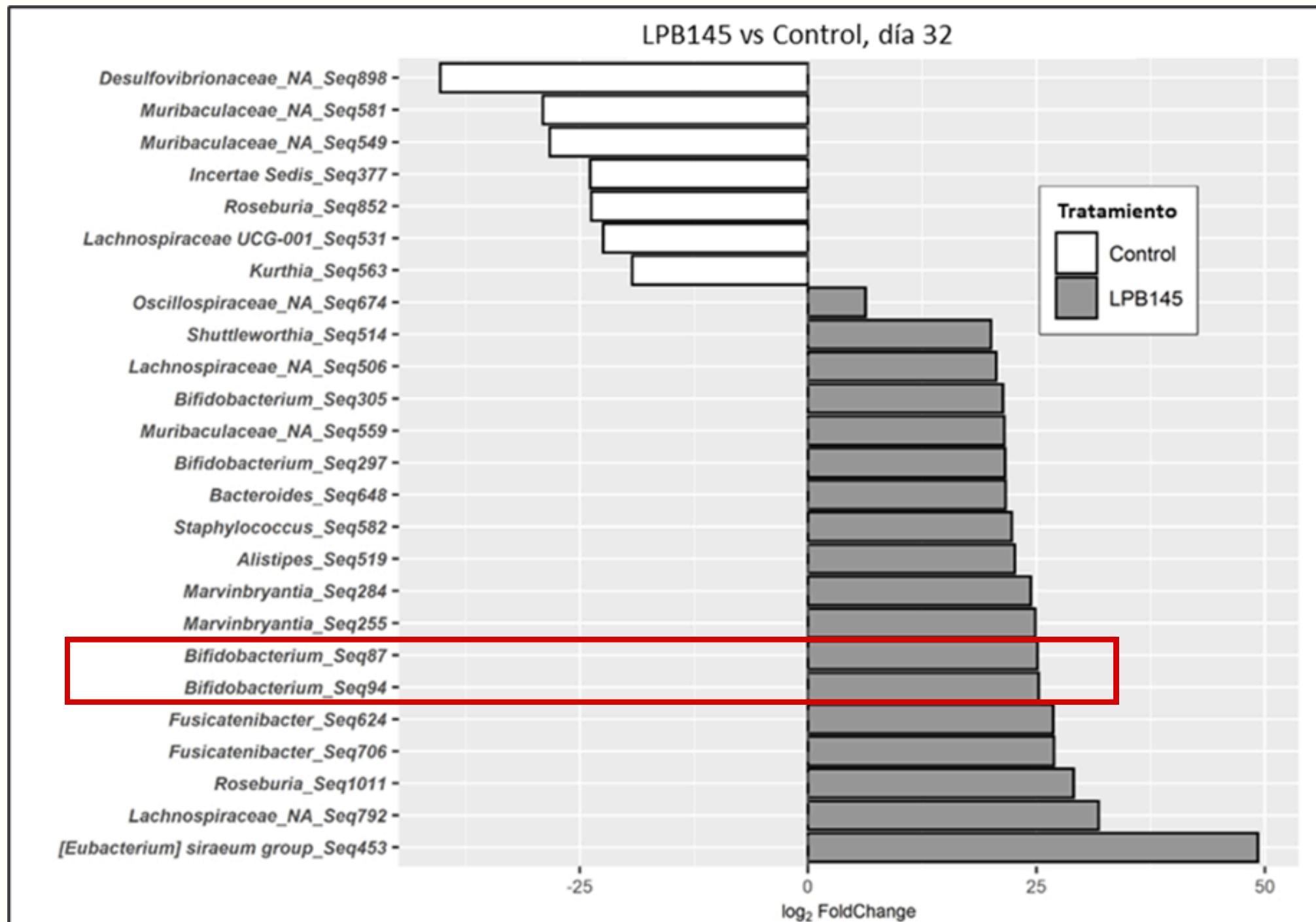
Yakult Central Institute for Microbiological Research, 1796 Yaho, Kunitachi, Tokyo, 186-8650, Japan

Correspondence  
Toshihiko Takada  
toshihiko-takada@yakult.co.jp

Se observó un aumento en varios taxones de bacterias similares filogenéticamente a bacterias potencialmente beneficiosas, como:

- *Roseburia*
- *Fusicatenibacter*
- *Bifidobacterium*
- *Alistipes*

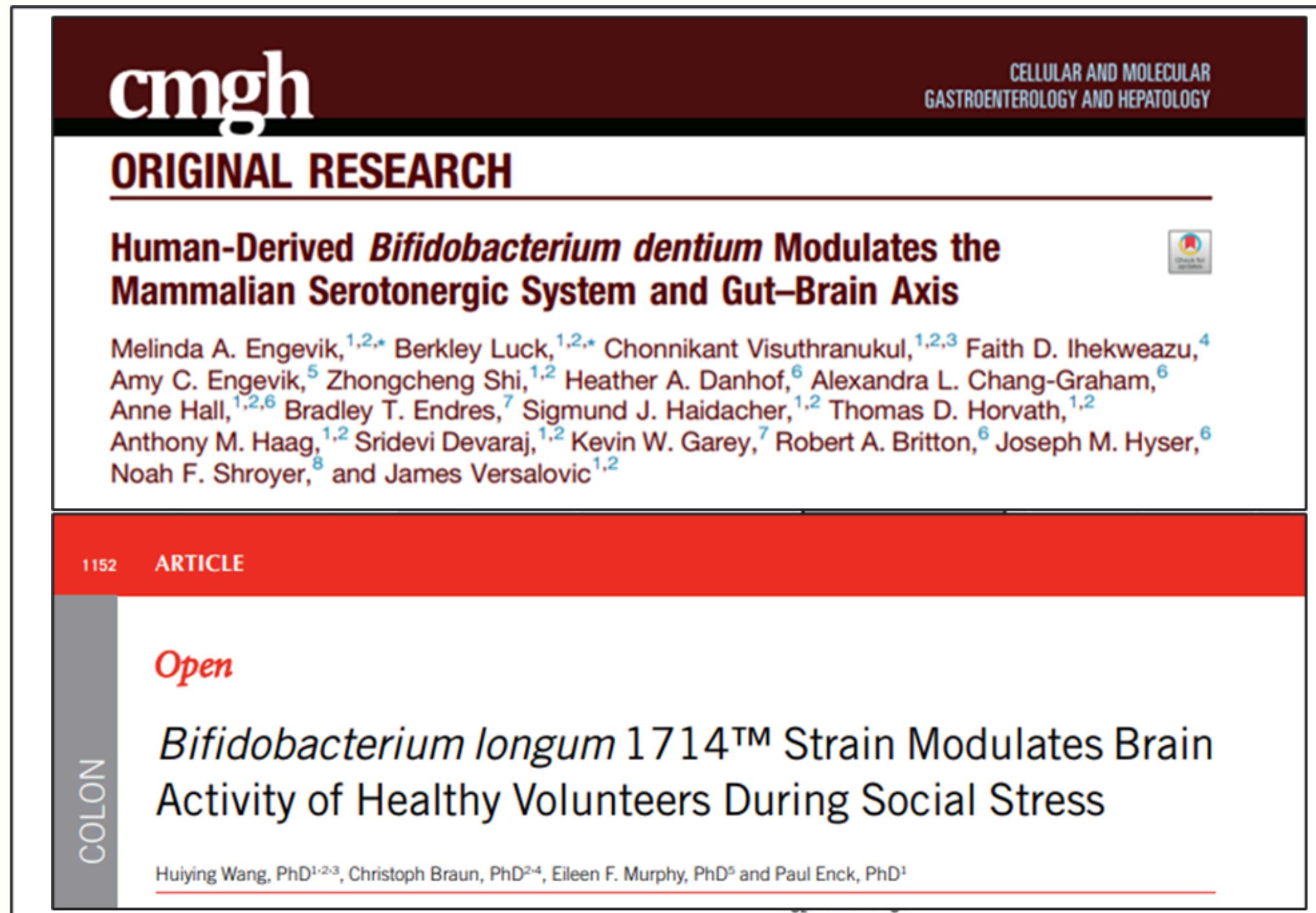
# Cambios en la abundancia relativa de taxones



Se observó un aumento en varios taxones de bacterias similares filogenéticamente a bacterias potencialmente beneficiosas, como:

- *Roseburia*
- *Fusicatenibacter*
- *Bifidobacterium*
- *Alistipes*

# Cambios en la abundancia relativa de taxones



**cmgh** CELLULAR AND MOLECULAR  
GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY

**ORIGINAL RESEARCH**

**Human-Derived *Bifidobacterium dentium* Modulates the Mammalian Serotonergic System and Gut–Brain Axis**

Melinda A. Engevik,<sup>1,2,\*</sup> Berkley Luck,<sup>1,2,\*</sup> Chonnikant Visuthranukul,<sup>1,2,3</sup> Faith D. Ihekweazu,<sup>4</sup> Amy C. Engevik,<sup>5</sup> Zhongcheng Shi,<sup>1,2</sup> Heather A. Danhof,<sup>6</sup> Alexandra L. Chang-Graham,<sup>6</sup> Anne Hall,<sup>1,2,6</sup> Bradley T. Endres,<sup>7</sup> Sigmund J. Haidacher,<sup>1,2</sup> Thomas D. Horvath,<sup>1,2</sup> Anthony M. Haag,<sup>1,2</sup> Sridevi Devaraj,<sup>1,2</sup> Kevin W. Garey,<sup>7</sup> Robert A. Britton,<sup>6</sup> Joseph M. Hyser,<sup>6</sup> Noah F. Shroyer,<sup>8</sup> and James Versalovic<sup>1,2</sup>

1152 ARTICLE

**Open**

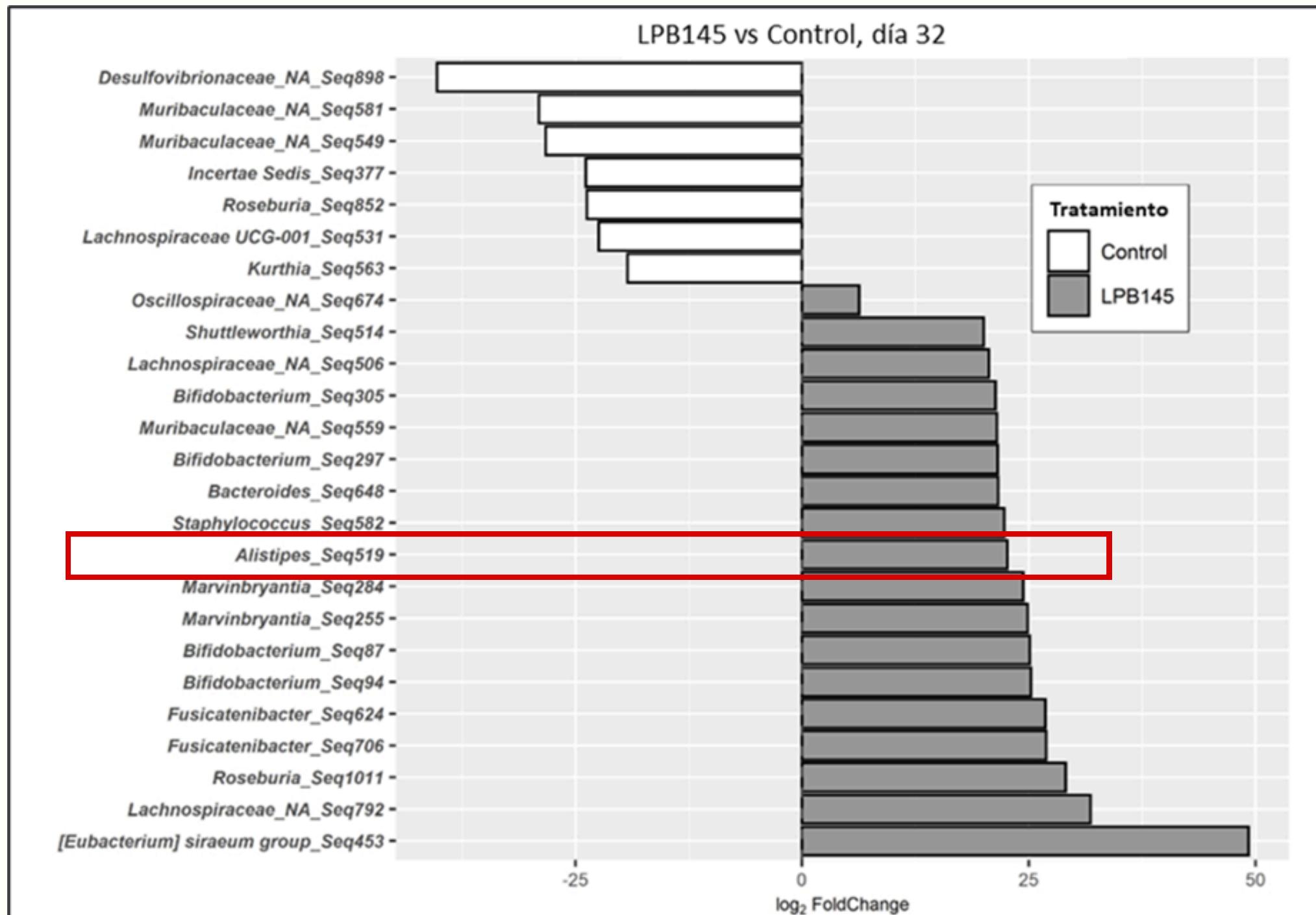
***Bifidobacterium longum* 1714™ Strain Modulates Brain Activity of Healthy Volunteers During Social Stress**

Huiying Wang, PhD<sup>1,2,3</sup>, Christoph Braun, PhD<sup>2,4</sup>, Eileen F. Murphy, PhD<sup>5</sup> and Paul Enck, PhD<sup>1</sup>

Se observó un aumento en varios taxones de bacterias similares filogenéticamente a bacterias potencialmente beneficiosas, como:

- *Roseburia*
- *Fusicatenibacter*
- *Bifidobacterium*
- *Alistipes*

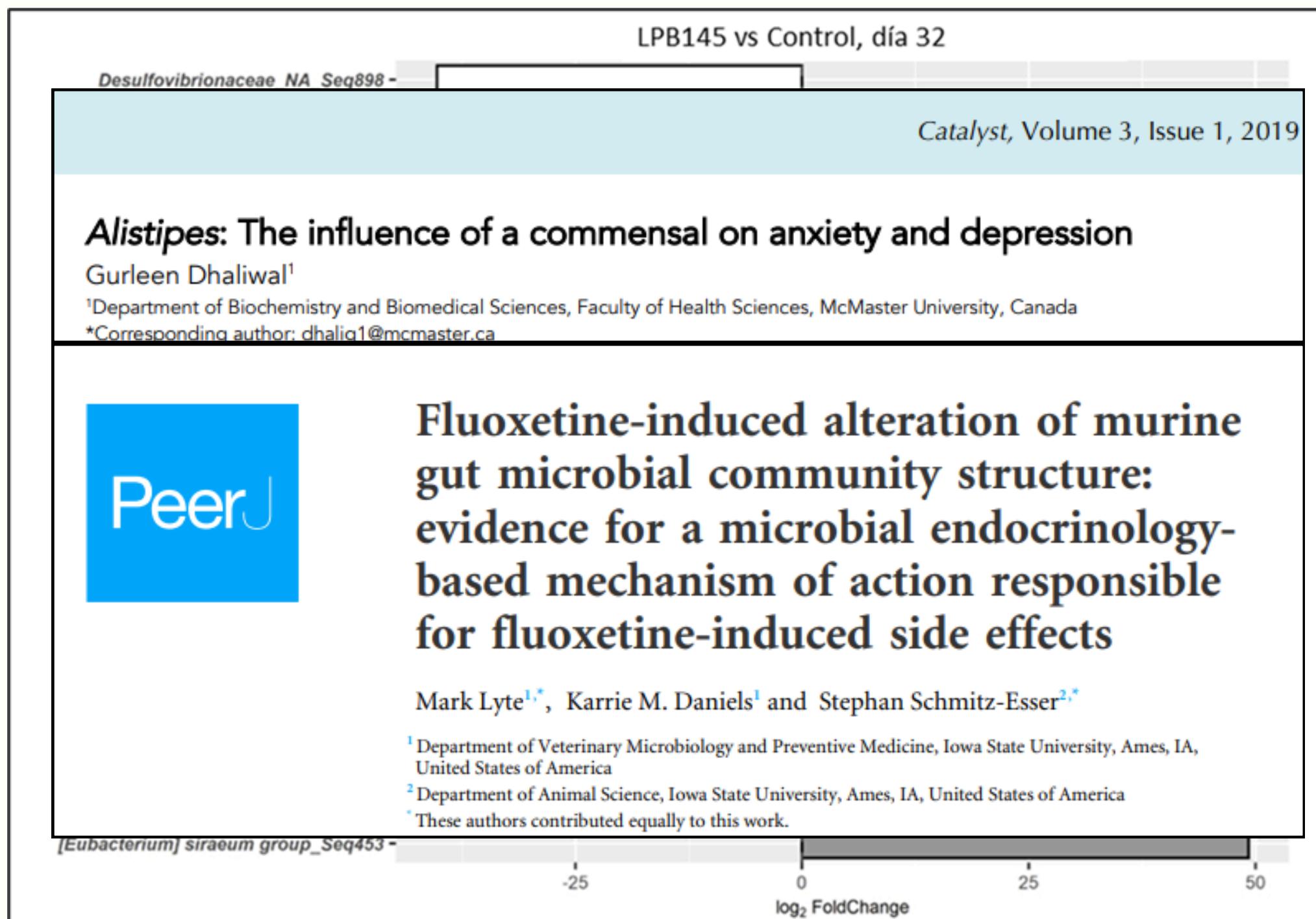
# Cambios en la abundancia relativa de taxones



Se observó un aumento en varios taxones de bacterias similares filogenéticamente a bacterias potencialmente beneficiosas, como:

- *Roseburia*
- *Fusicatenibacter*
- *Bifidobacterium*
- *Alistipes*

# Cambios en la abundancia relativa de taxones



Se observó un aumento en varios taxones de bacterias similares filogenéticamente a bacterias potencialmente beneficiosas, como:

- *Roseburia*
- *Fusicatenibacter*
- *Bifidobacterium*
- *Alistipes*

# Discusión

- El tratamiento con la cepa LPB145 no generó un impacto significativo en la diversidad alfa y beta de la de la población microbiana intestinal.
- Sí se observaron cambios en ASV asociados a géneros particulares relacionados filogenéticamente a bacterias con conexión directa a modulación del eje MIC.
- Hubo cambios asociados al transcurso del ensayo en ambos grupos, con diferencias significativas entre las MI al periodo inicial y final.

# Discusión

- El tratamiento con la cepa LPB145 no generó un impacto significativo en la diversidad alfa y beta de la de la población microbiana intestinal.
- Sí se observaron cambios en ASV asociados a géneros particulares relacionados filogenéticamente a bacterias con conexión directa a modulación del eje MIC.
- Hubo cambios asociados al transcurso del ensayo en ambos grupos, con diferencias significativas entre las MI al periodo inicial y final.

Beneficial effect of GABA-producing *Lactiplantibacillus* strain LPB145 isolated from cheese starters evaluated in anxiety- and depression-like behaviours in rats

In: [Beneficial Microbes](#)

Authors: J. Lozano , S. Fabius , S. Fernández-Ciganda , J. Urbanavicius , C. Piccini , C. Scorza , and P. Zunino 

Online Publication Date: 04 Jul 2024

# Caracterización genómica de LPB 145

## Características generales

Cromosoma: 3.111.197 pb

Contenido GC: 44.8%

CDSs: 2950

tRNAs: 67

rRNAs: 16

Tres plásmidos

## Potenciales atributos como probiótico

Genes de Síntesis de EPS (matriz de biofilms, adhesión, etc)

Genes vinculados a adhesión a mucus

Metabolismo de ácidos biliares (ej. hidrolasas de sales biliares)

Producción de bacteriocinas

Síntesis de GABA (gadB)

Síntesis de vitaminas del grupo B (ej. biotina, tiamina, ácido fólico)

**Ausencia de elementos móviles de resistencia a antimicrobianos y de genes de virulencia**

# Conclusiones

- Cepas bacterianas empleadas en fermentación en alimentos poseen atributos como **potenciales probióticos**.
- Las cepas del grupo *Lpb* que mostraron **alta producción de GABA** poseen potencial biotecnológico para su uso en alimentos funcionales.
- **Cambios sutiles** en la microbiota intestinal causados por la administración oral crónica de una cepa seleccionada puede llevar a **cambios en el comportamiento**.
- La cepa LPB145 reviste interés como **potencial herramienta terapéutica** para el manejo de trastornos emocionales.

# Muchas Gracias



Pablo Zunino



Sofía Fernandez



Sara Fabius



Cecilia Scorza



Claudia Piccini



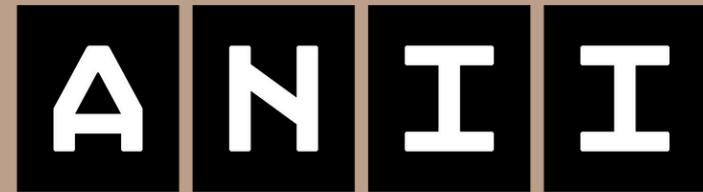
Álvaro González



Marcela Martínez



Jessika Urbanavicius



Ministerio  
de Educación  
y Cultura