

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

Dr. Pablo Zunino

Departamento de Microbiología,

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

Montevideo,
Uruguay
2024

Queseria 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.

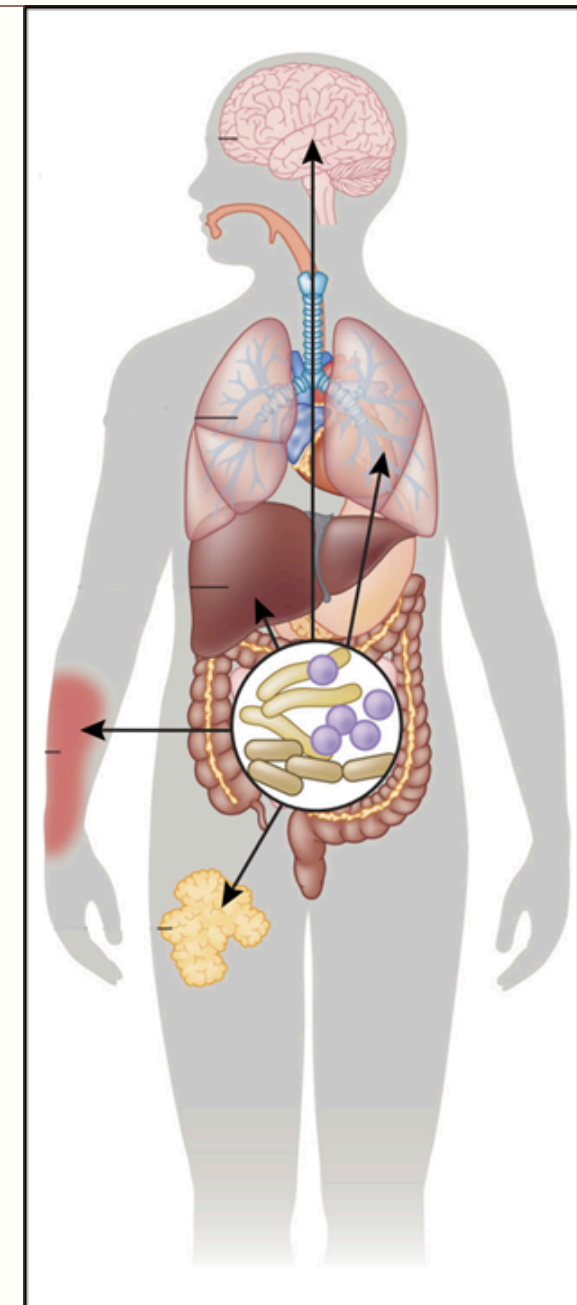


Microbiota Intestinal

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)

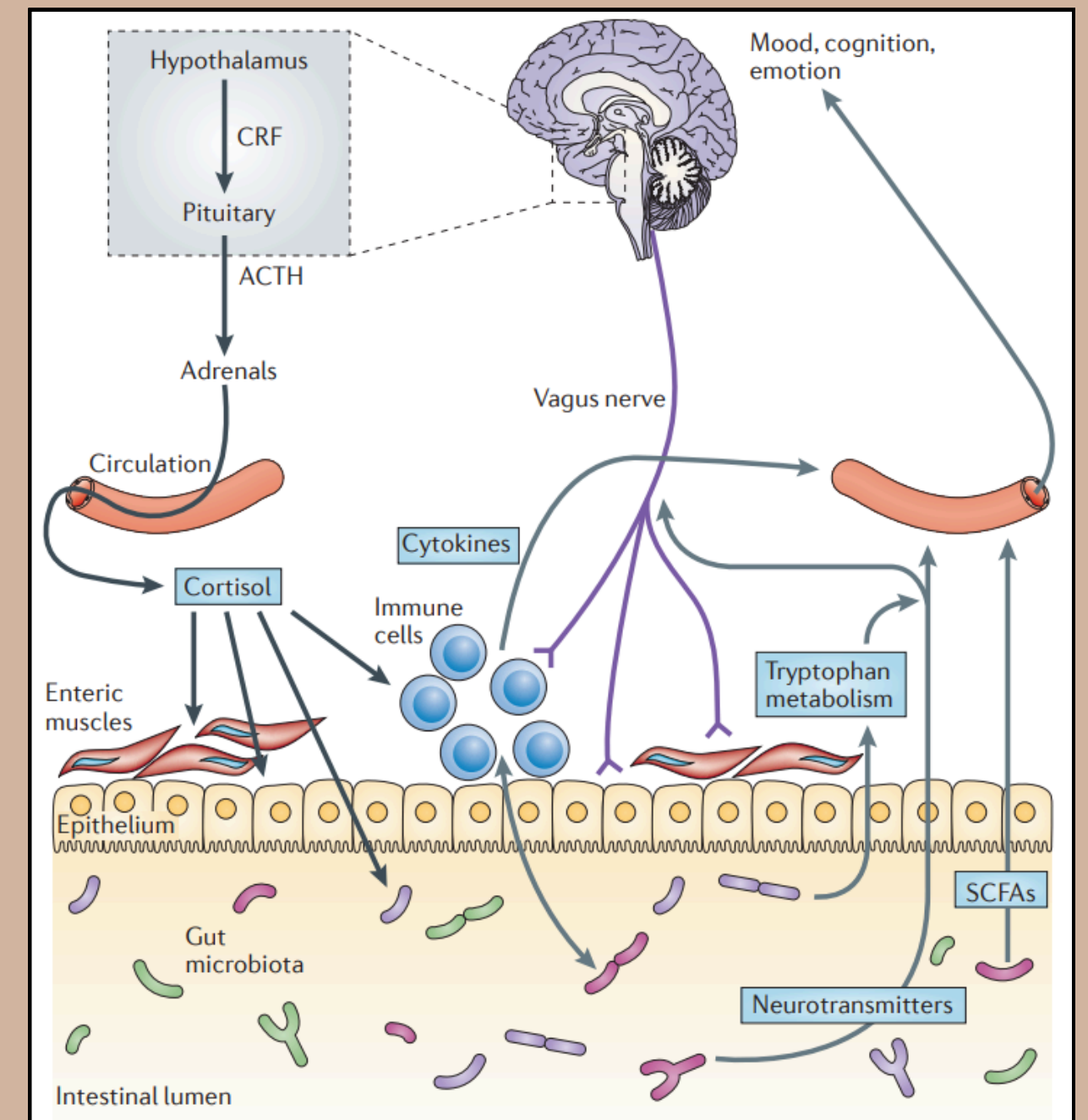


Eje Microbiota-Intestino-Cerebro

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.



Mejora la
digestión



Reduce
alergias



Mejora el
metabolismo
lipídico



Estimula el
sistema inmune



Efectos
sobre la salud
mental

[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](#) ^(a1) 

DOI: <https://doi.org/10.1192/bjp.56.234.422> Published online by Cambridge University Press: 19 February 2011

Extract

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

Whether the constipation is dependent on defective innervation and is a direct symptom of the mental disturbance, or whether it 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. ⁽¹⁾ 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.

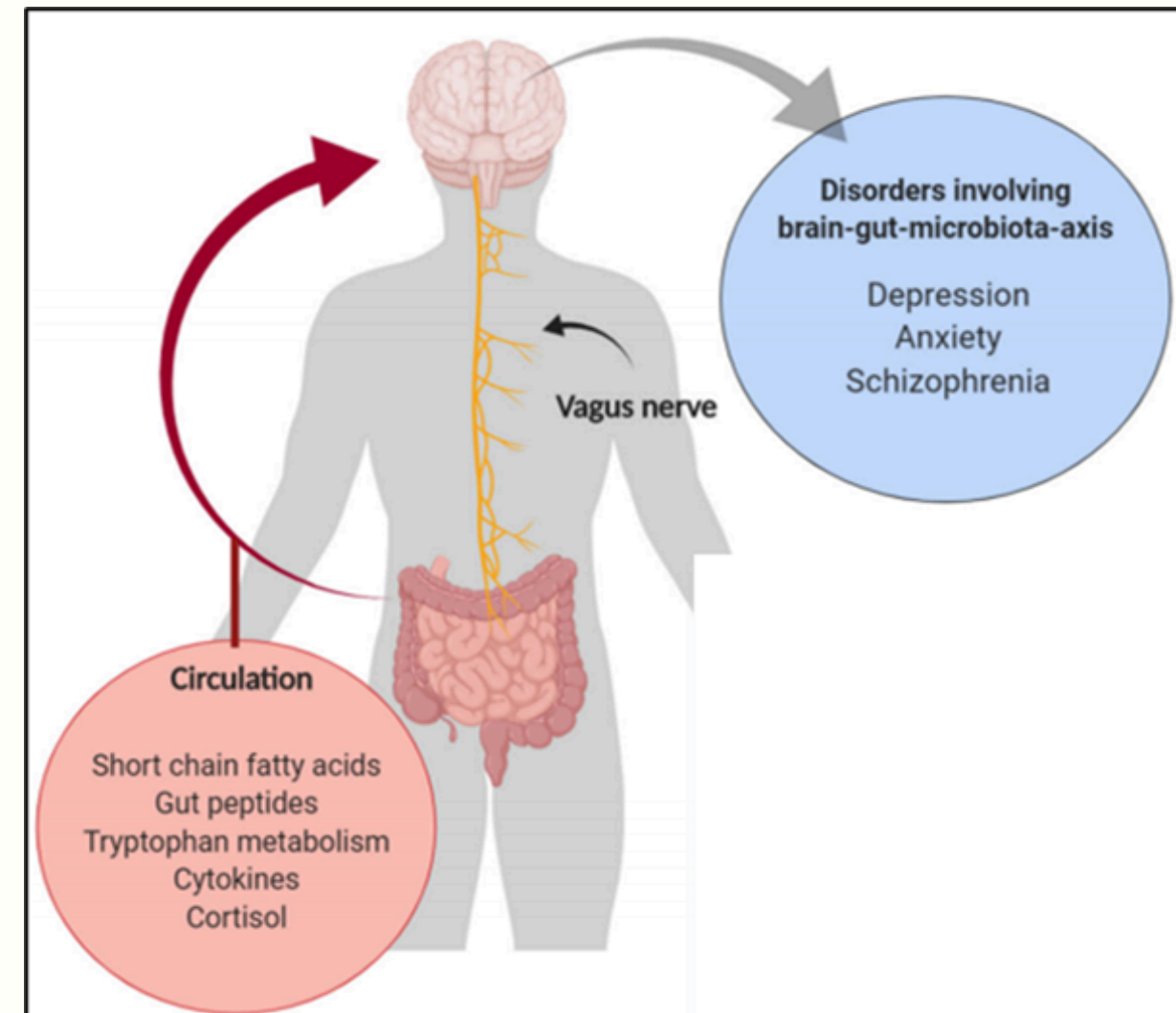
We have ample evidence of this impaired metabolism with its toxæmia. The patient has a sallow, muddy complexion, a dry skin, a parched, furred tongue, a high-tension pulse, brittle nails and lustreless hair, a scanty high-coloured urine

Probióticos y salud mental

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

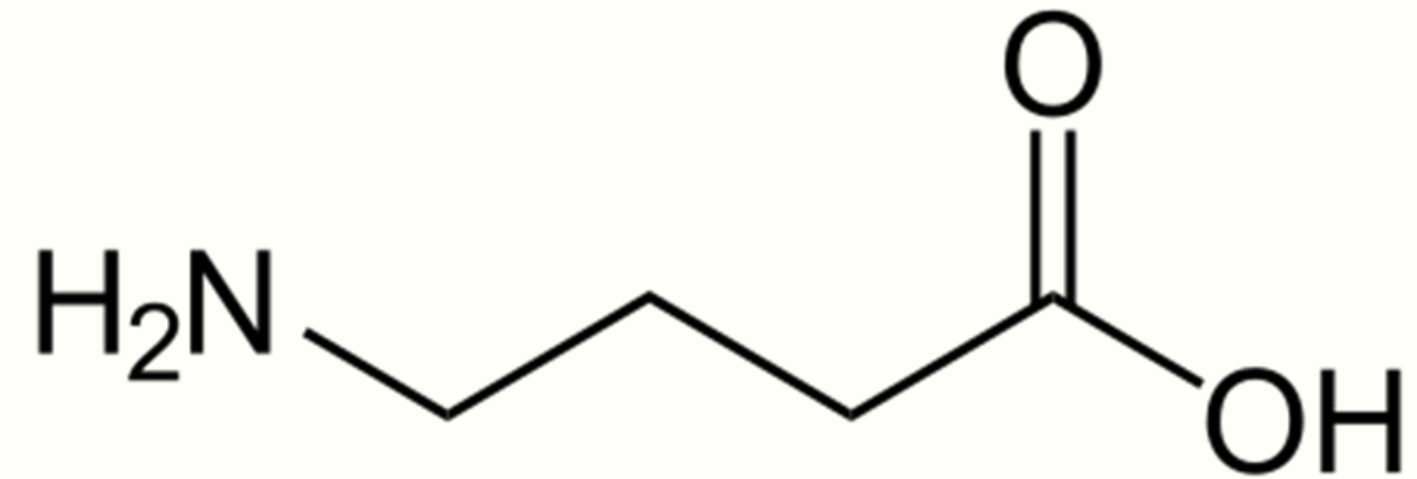
Los mecanismos de acción principales son:

- 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.



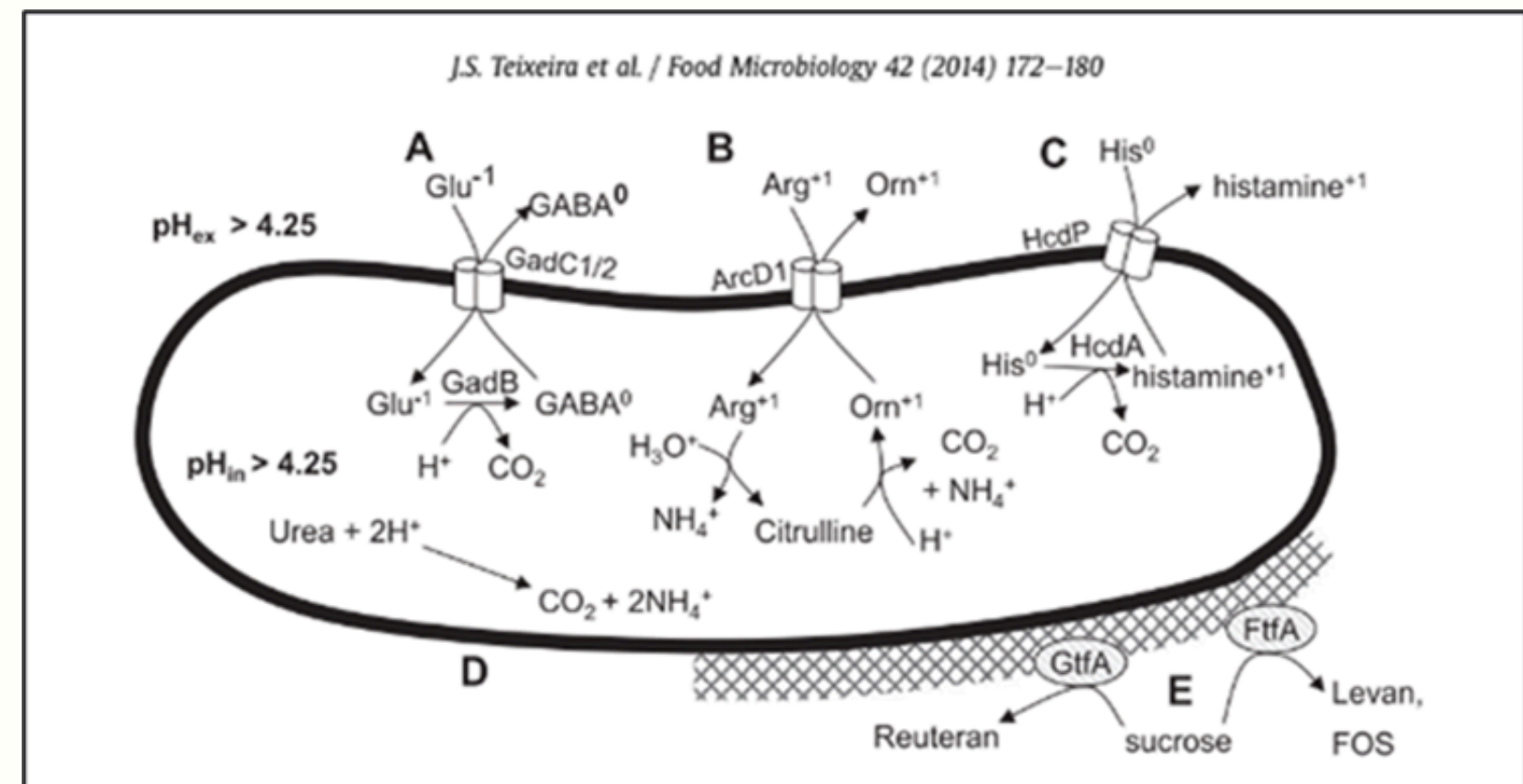
Ácido γ -aminobutírico (GABA)

- 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 ácido mediante la descarboxilación del glutamato.



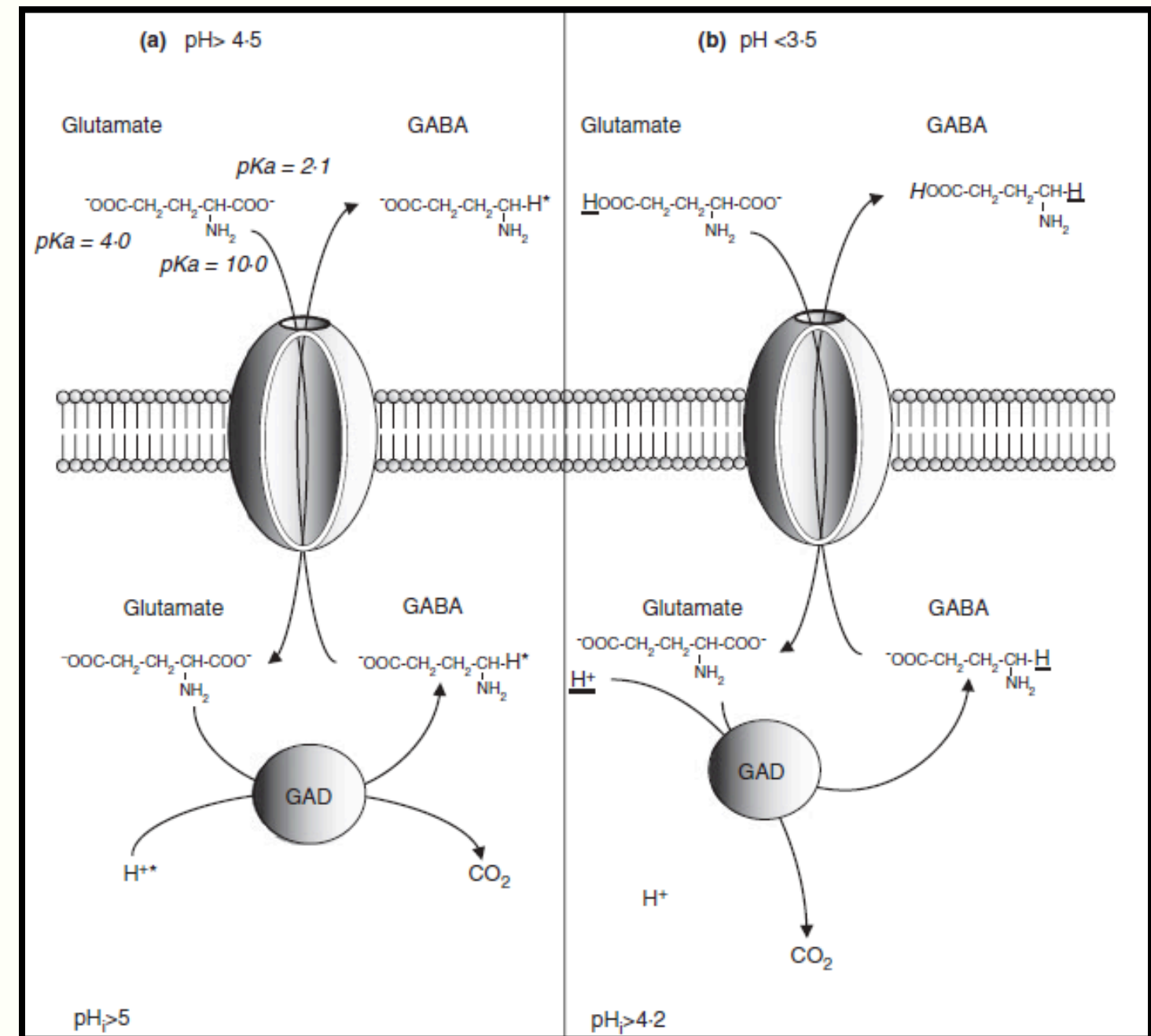
Toda esta maquinaria molecular se encuentra codificada dentro del operón *gad*, el cual es activado en medios con abundancia de aminoácidos libres y pH bajos.

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 ácido.

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

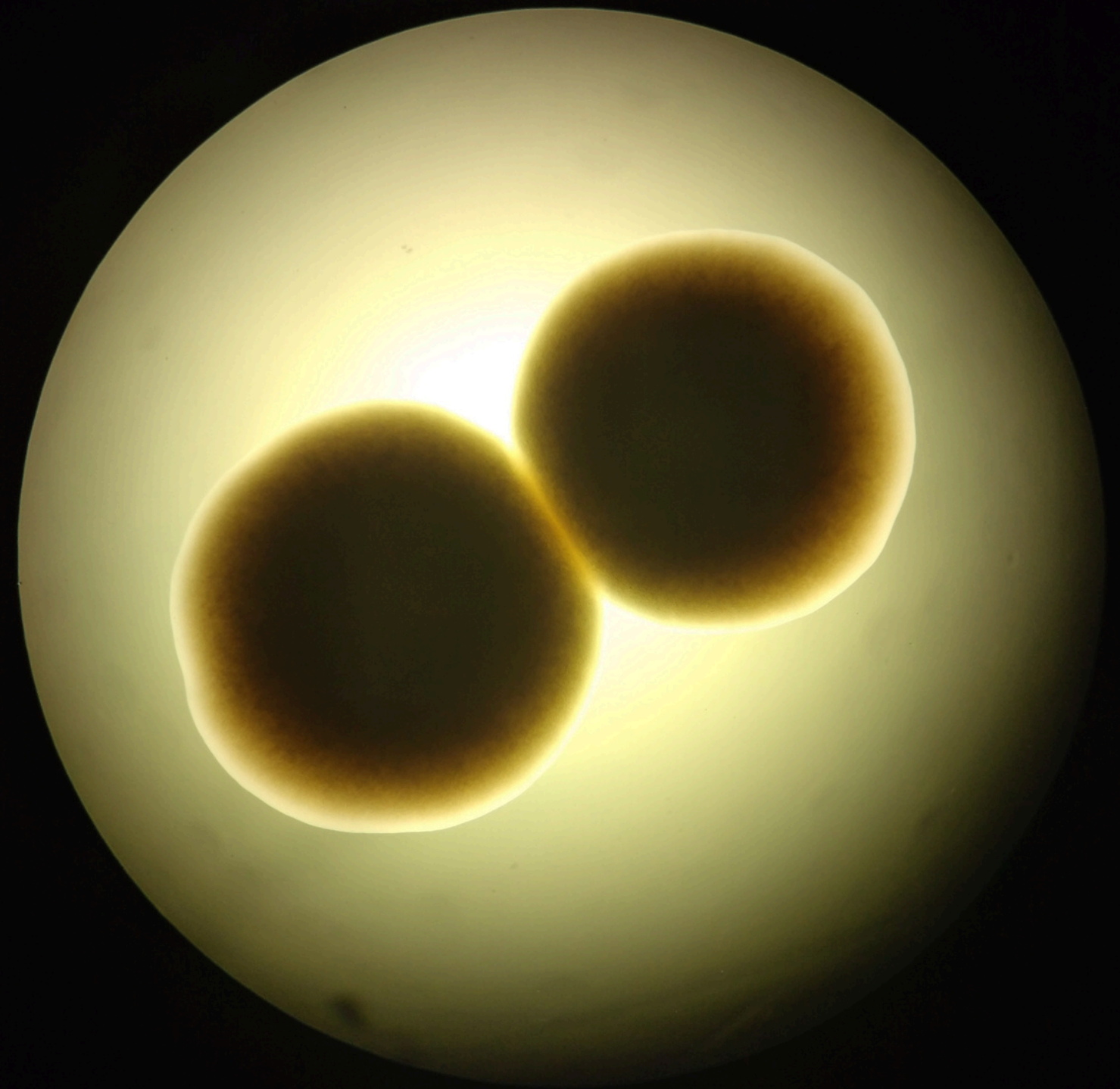
Caracterizar diferentes propiedades probióticas de cepas aisladas de SFN de queserías artesanales nacionales *in vitro*, y evaluar el efecto de la administración crónica de una de ellas en modelos comportamentales de ansiedad y depresión en ratas, incluyendo la caracterización del impacto sobre la comunidad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

Lozano et al., 2022

**Identificación por
secuenciación del gen
16S**

**Resistencia en medios
ácidos y sales biliales**

Maragkoudakis et al., 2006

**Evaluación de
capacidad de
adhesión a mucus**

Sugimura et al. 2011

**Evaluación de
capacidad de
formación de biofilms**

Lebeer et al., 2008

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

Lozano et al., 2022

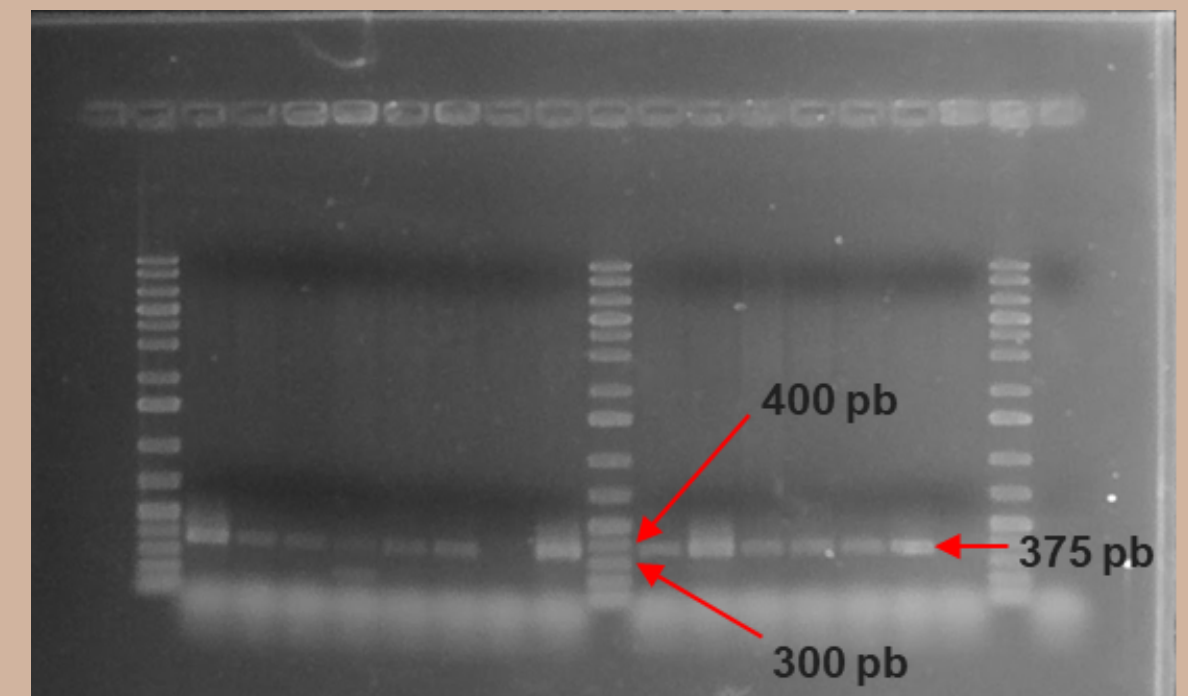
Presencia del gen *gadB*

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

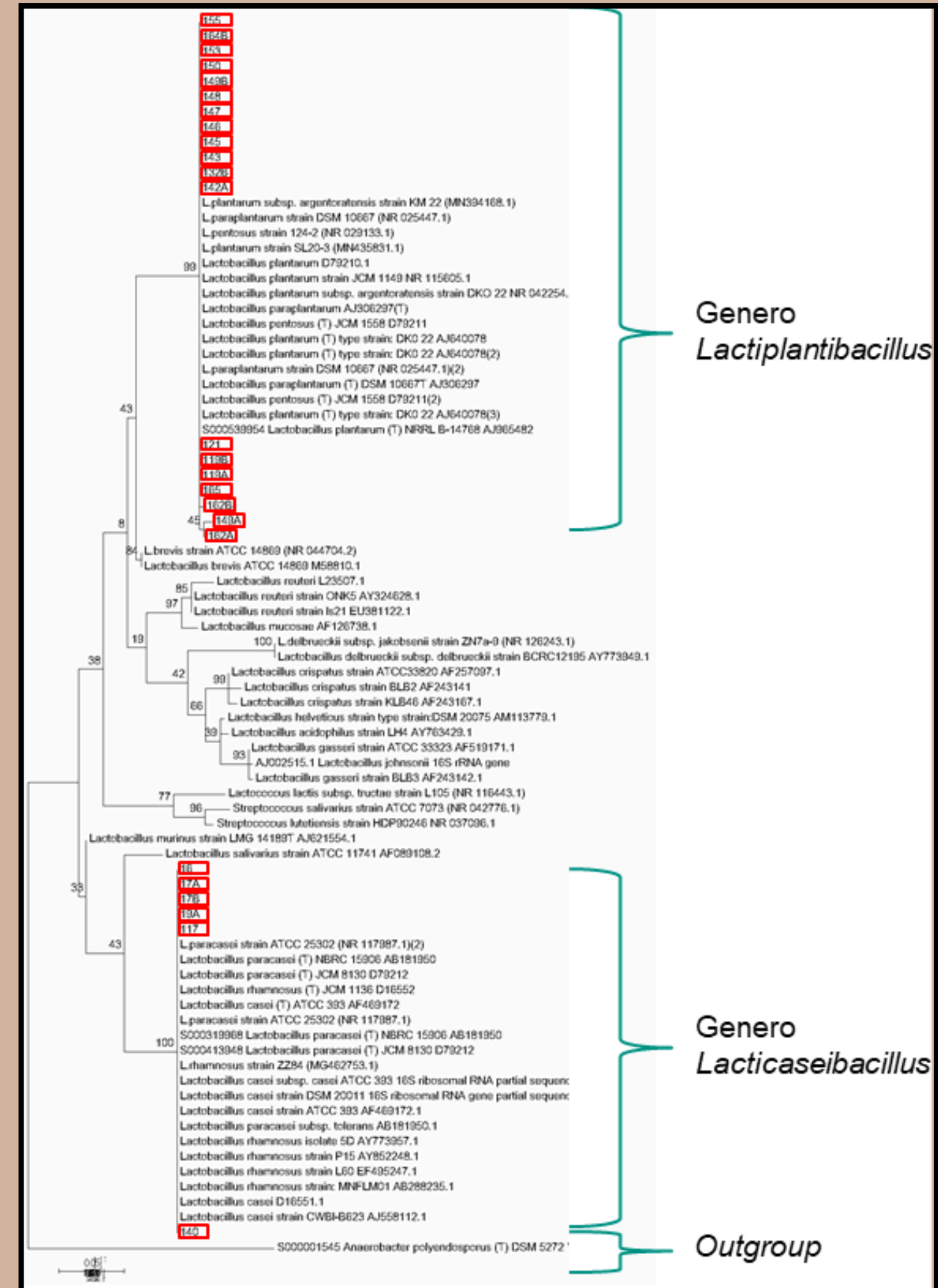


Identificación taxonómica

Se amplificó y secuenció el rADN 16S

Las cepas pertenecen a los géneros:

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

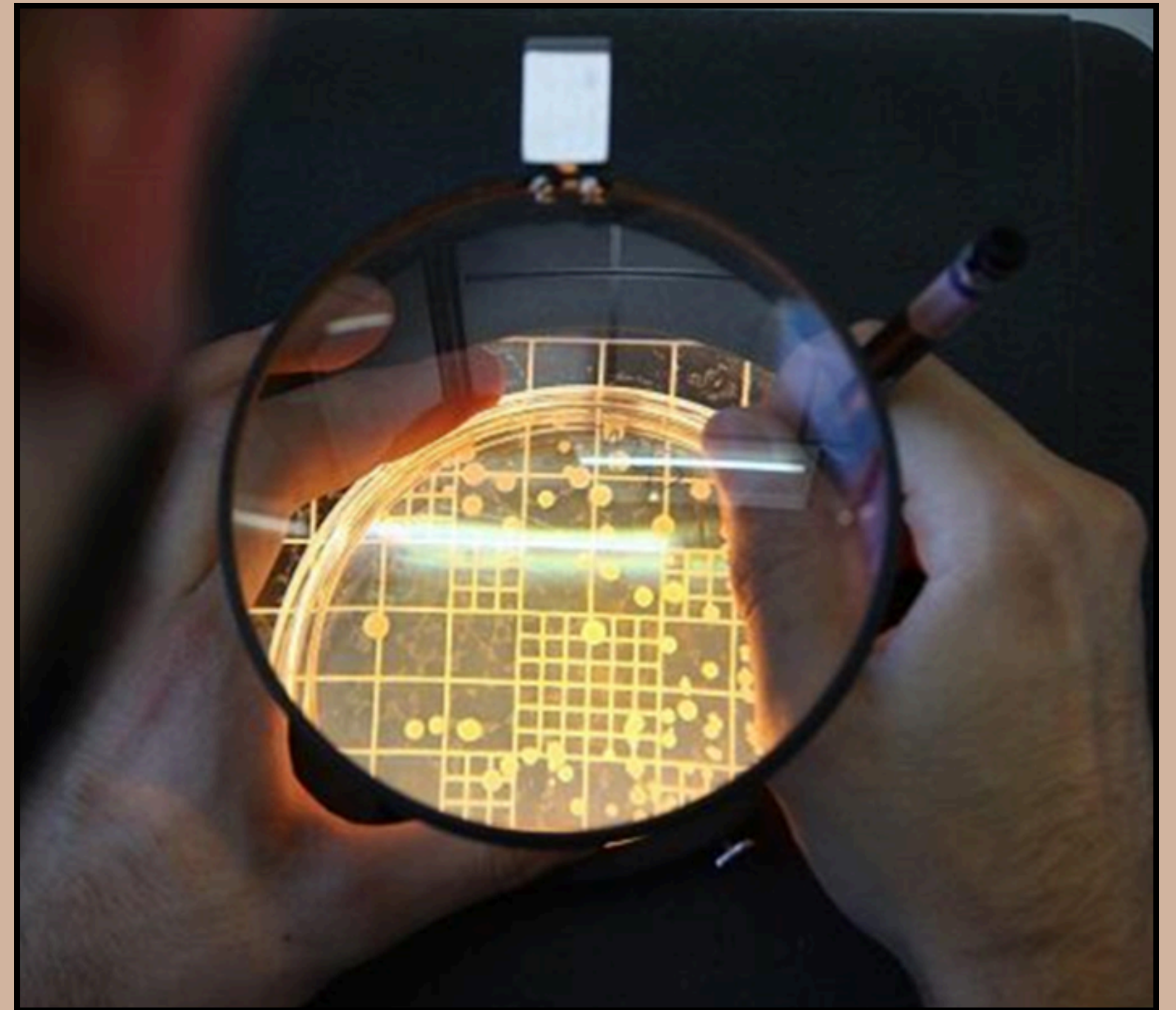


Resistencia en medios ácidos y presencia de sales biliares

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

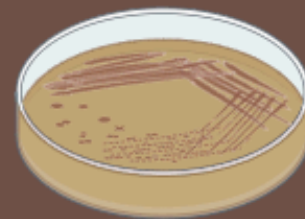
Sugimura *et al.* 2011
Owehand *et al.* 1999

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



Suspensión bacteriana



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



48 horas a 37°C en medio mTSB

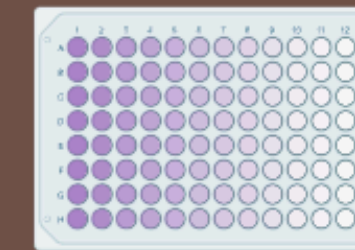
48 horas a 37°C en medio MRS adicionado con ácido glutámico 10mg/ml a pH=5



Extracción de mucus con las bacterias adheridas



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



Medición de absorbancia a 590 nm

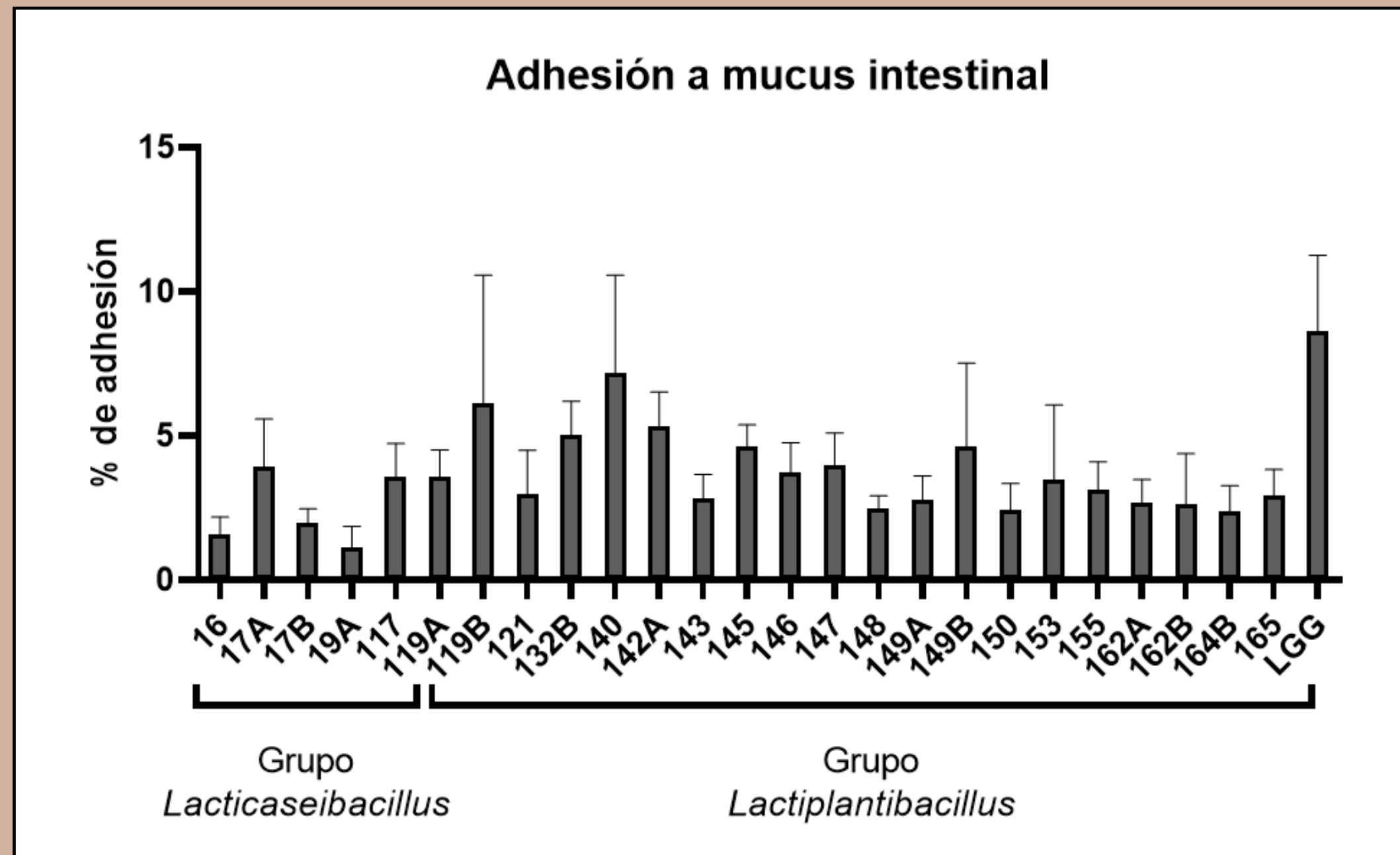
Tinción con cristal violeta

Toma de muestras a las 24 y 48 horas

Medición de GABA en sobrenadante de cultivo bacteriano



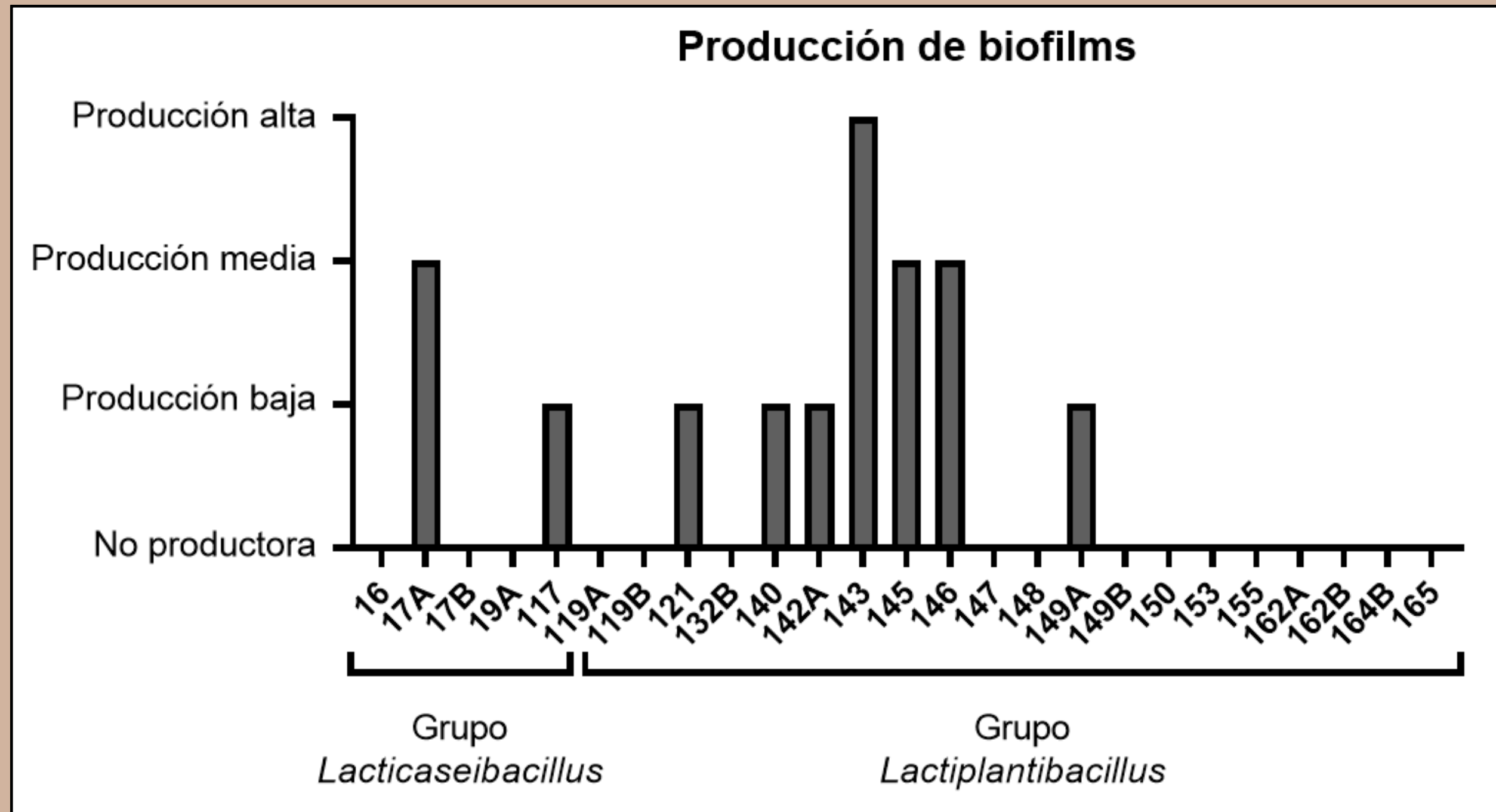
Evaluación de capacidad de adhesión a mucus



Sugimura *et al.* 2011

Owehand *et al.* 1999

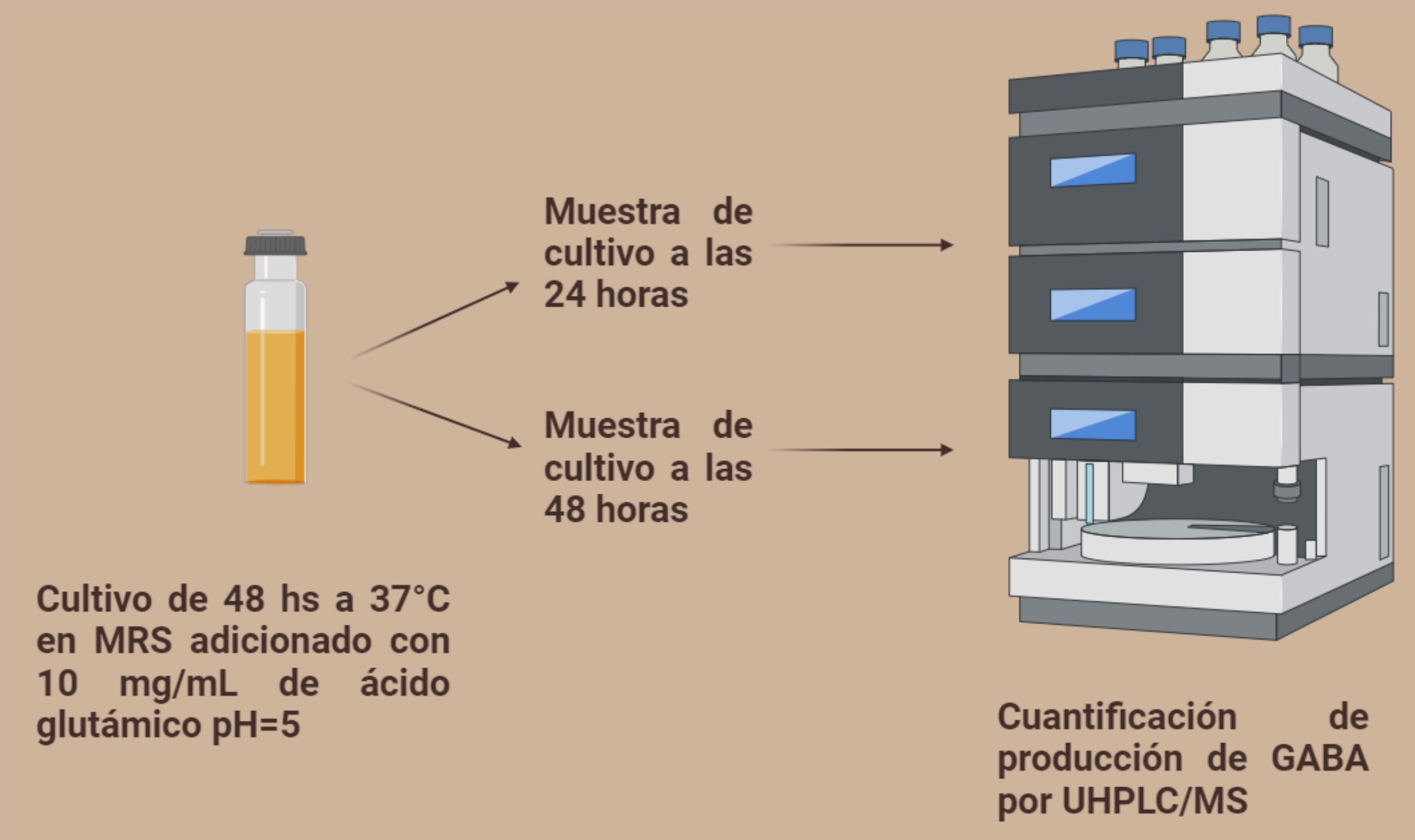
Evaluación de capacidad de formación de biofilms



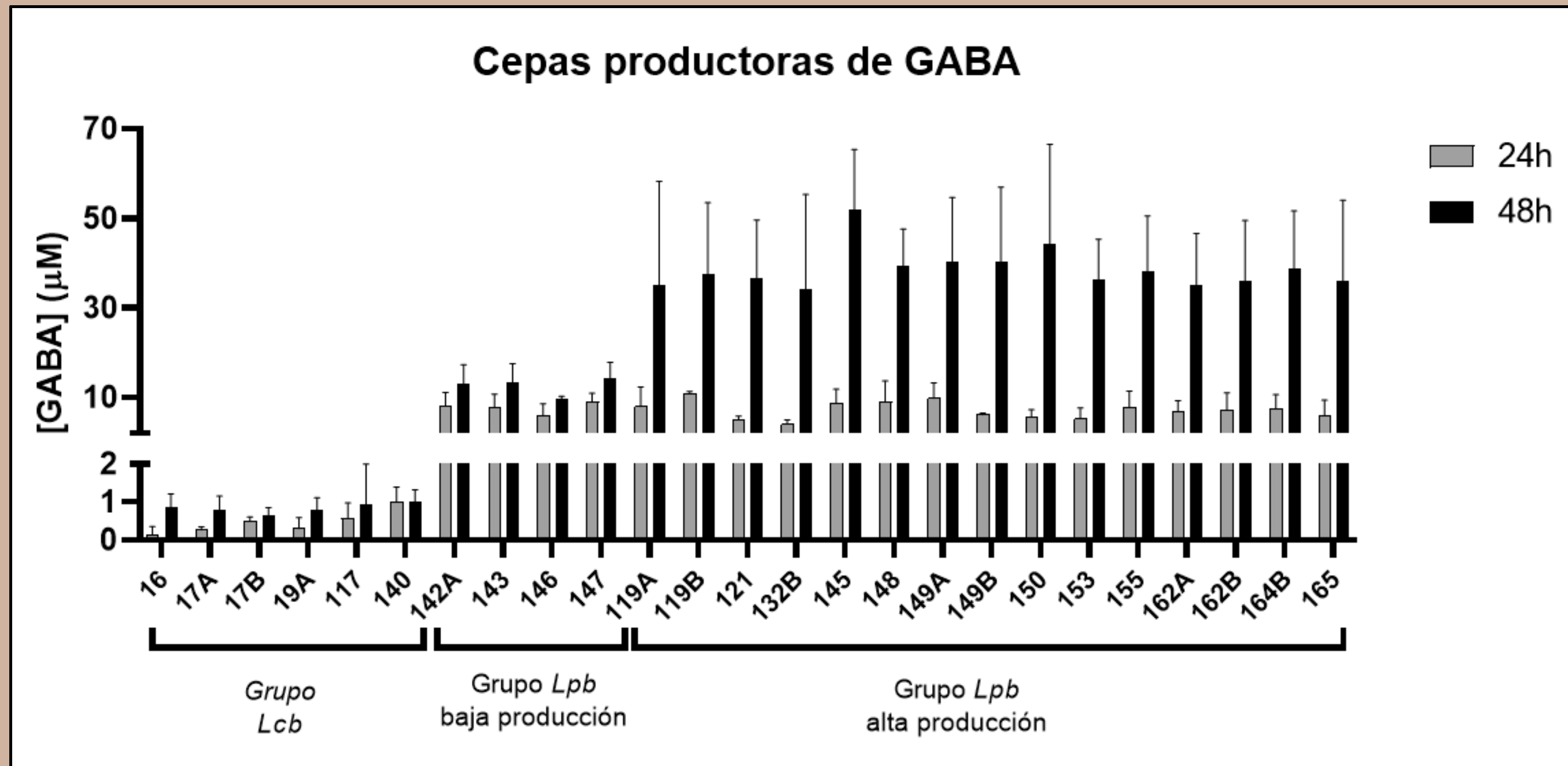
Lebeer et al., 2008

Stefanovic et al., 2000

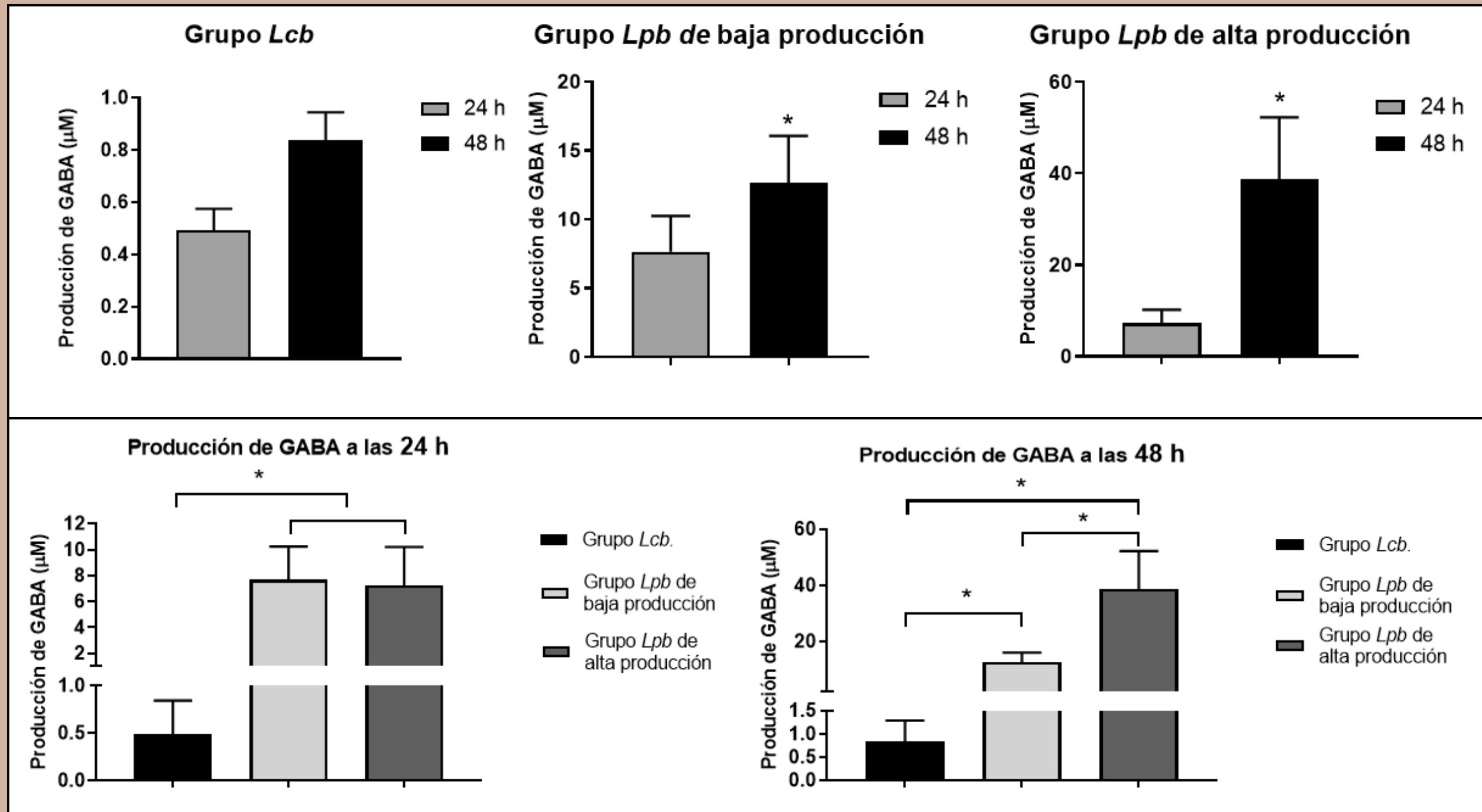
Cuantificación de la producción de GABA por UHPLC/MS



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*



Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



Selección de cepa candidata para ensayos *in vivo*



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 *Lactobacillus* (Shan *et al.*, 2015).

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

ORIGINAL ARTICLE

Journal of
Applied Microbiology **sfam**

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

Joaquin Lozano¹  | Sofía Fernández-Ciganda^{1,2} | Álvaro González Revello³ |
Darío Hirigoyen³ | Marcela Martínez⁴ | Cecilia Scorza⁵ | Pablo Zunino¹

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

Día 0

Día 4

Día 32

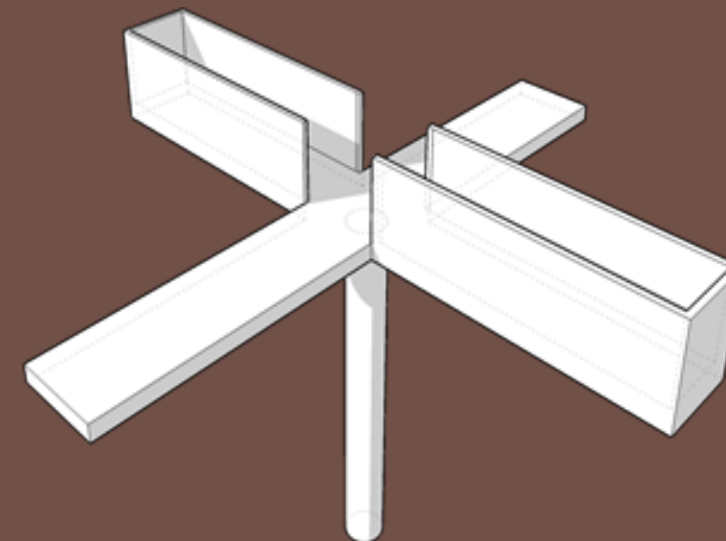
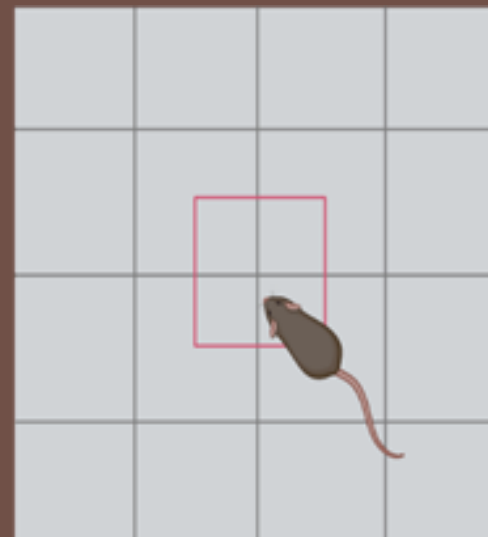
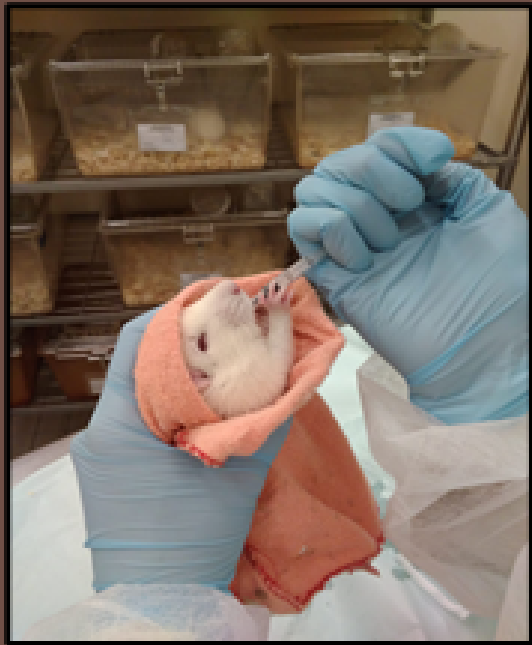
Día 33

Adiestramiento de administración oral con vehículo

Comienzo de administración oral de las cepas

-Campo abierto
-Laberinto en cruz elevado
-Pre-test de nado forzado

-Test de nado forzado



Diseño experimental

Día 0

Día 4

Día 32

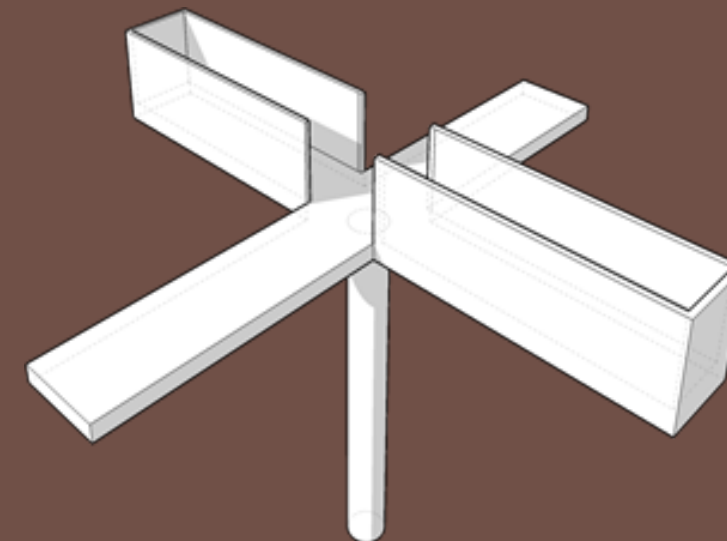
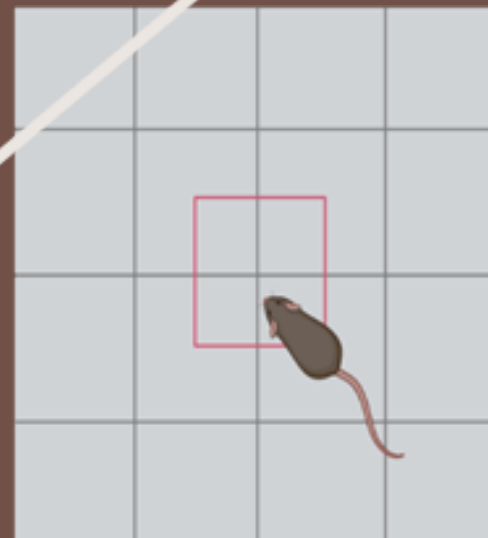
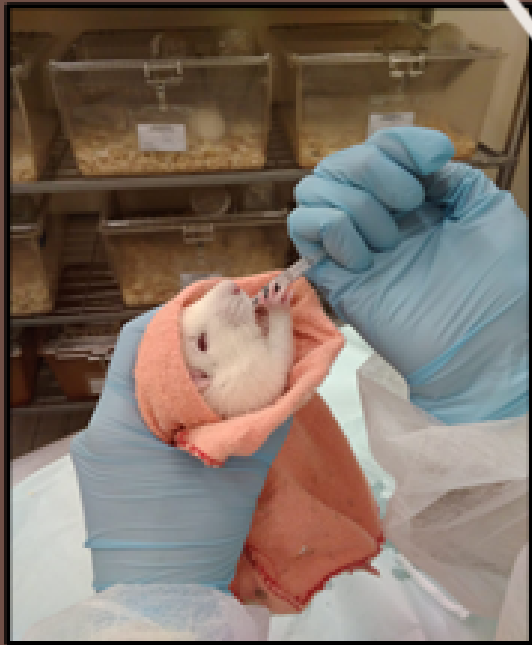
Día 33

Adiestramiento
de
administración
oral con vehículo

Comienzo de
administración oral
de las cepas

-Campo abierto
-Laberinto en
cruz elevado
-Pre-test de
nado forzado

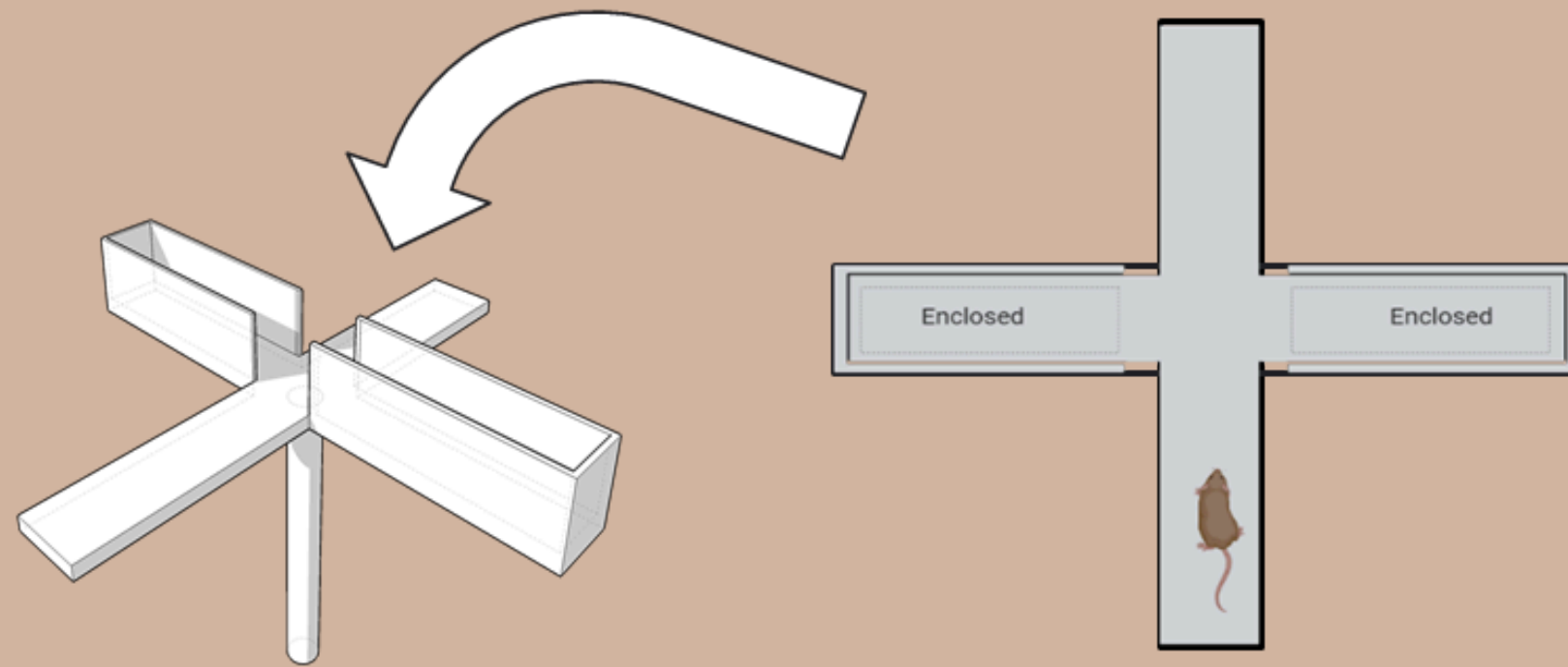
-Test de nado
forzado



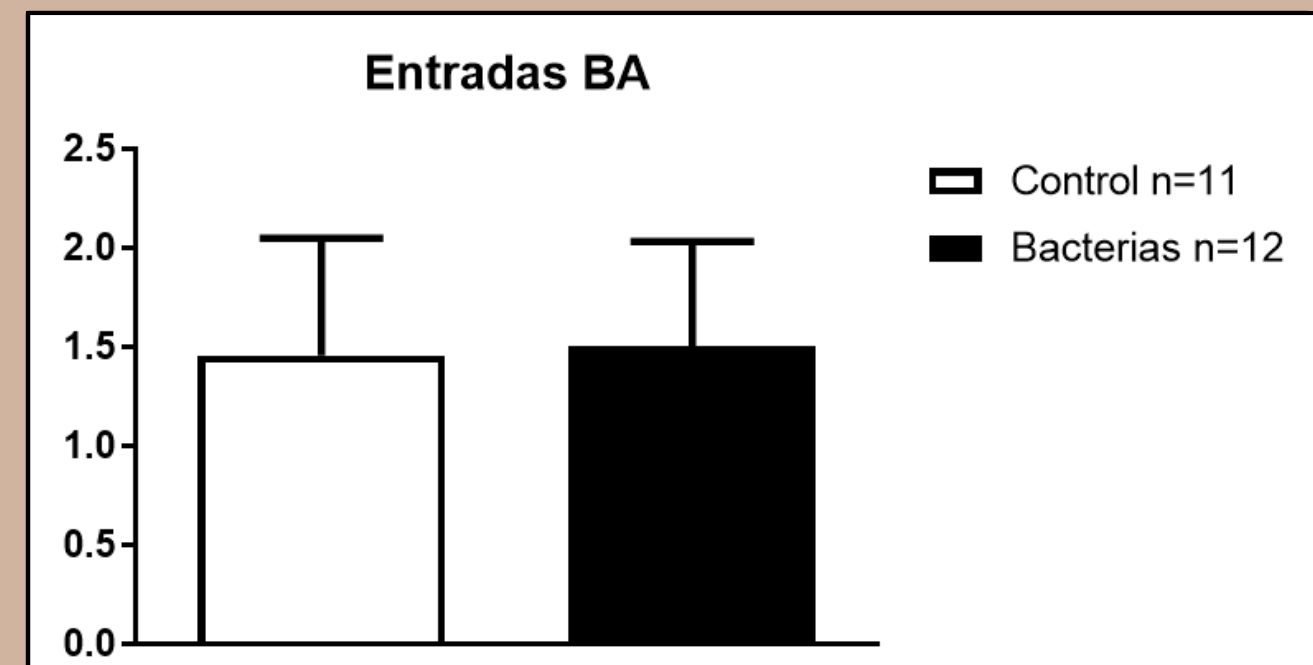
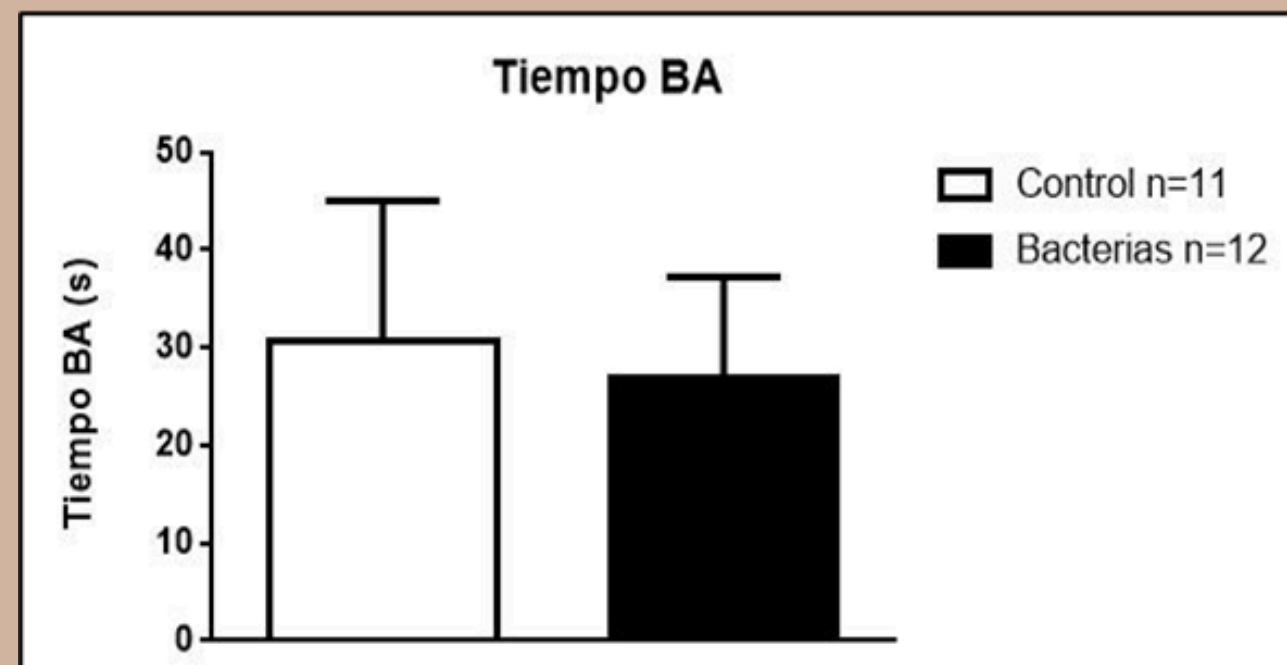
Extracción ADN fecal para análisis de la microbiota
intestinal por secuenciación del ADNr 16S

Resultados comportamentales

Laberinto en cruz elevado



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

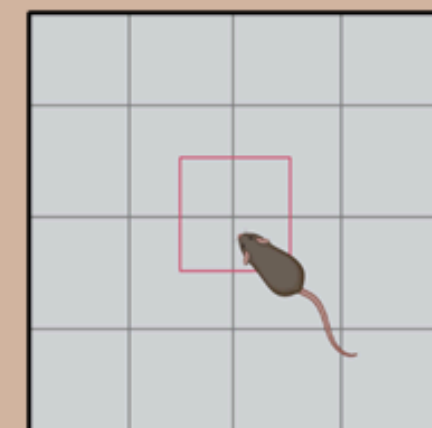
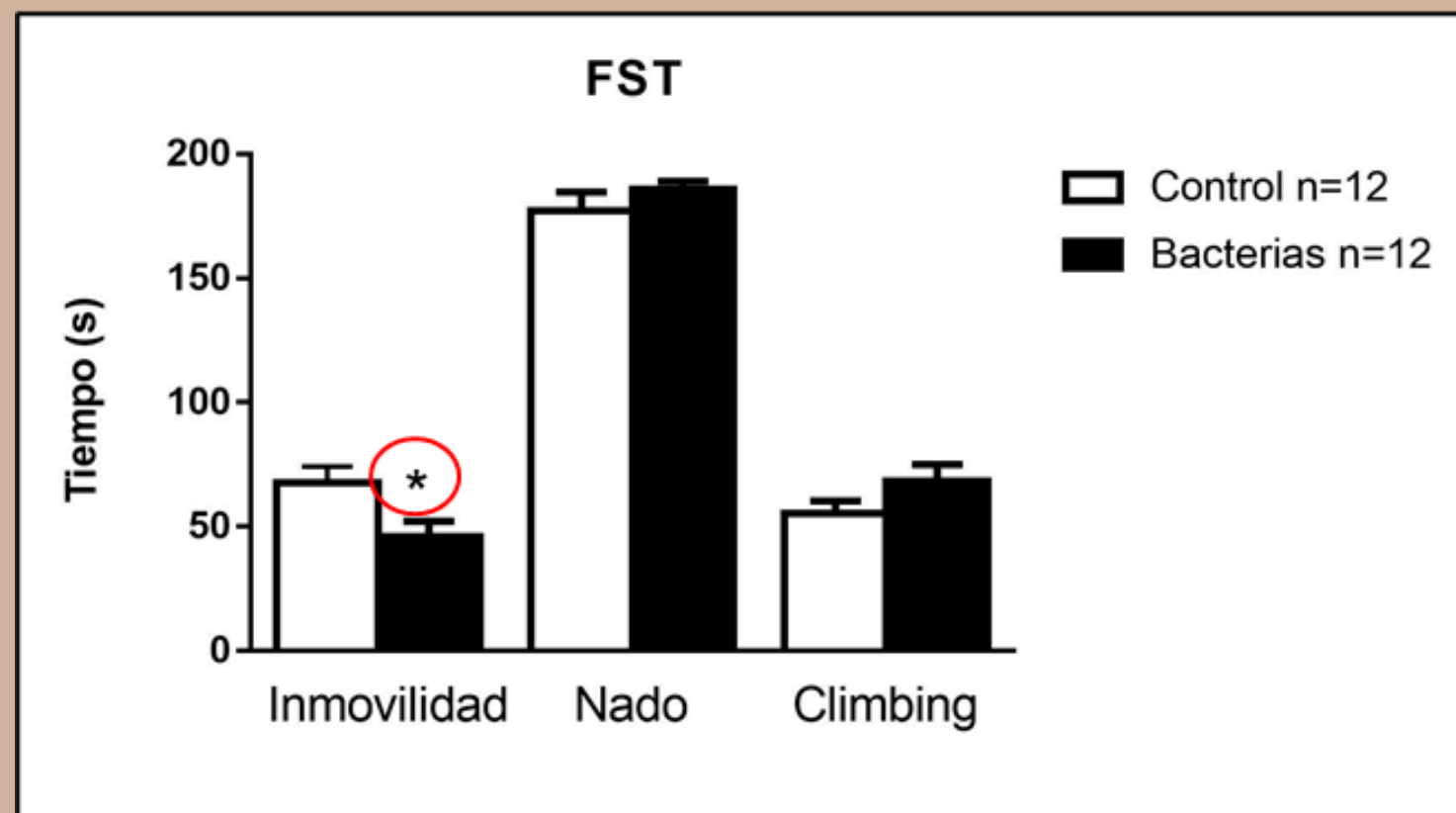


Test de nado forzado



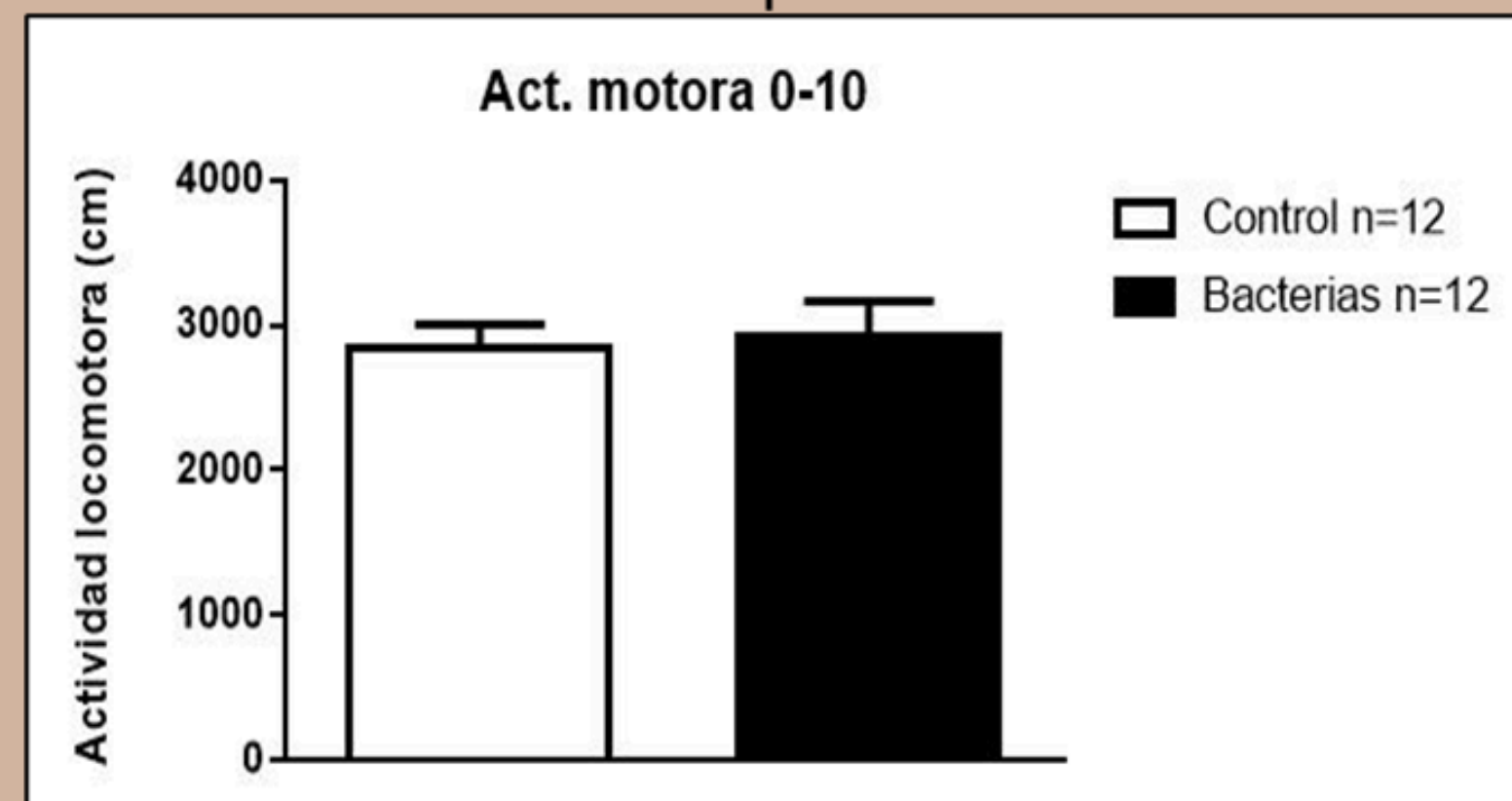
Modelo de evaluación
de efectos tipo-
antidepresivo en
tratamientos con
fármacos

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)

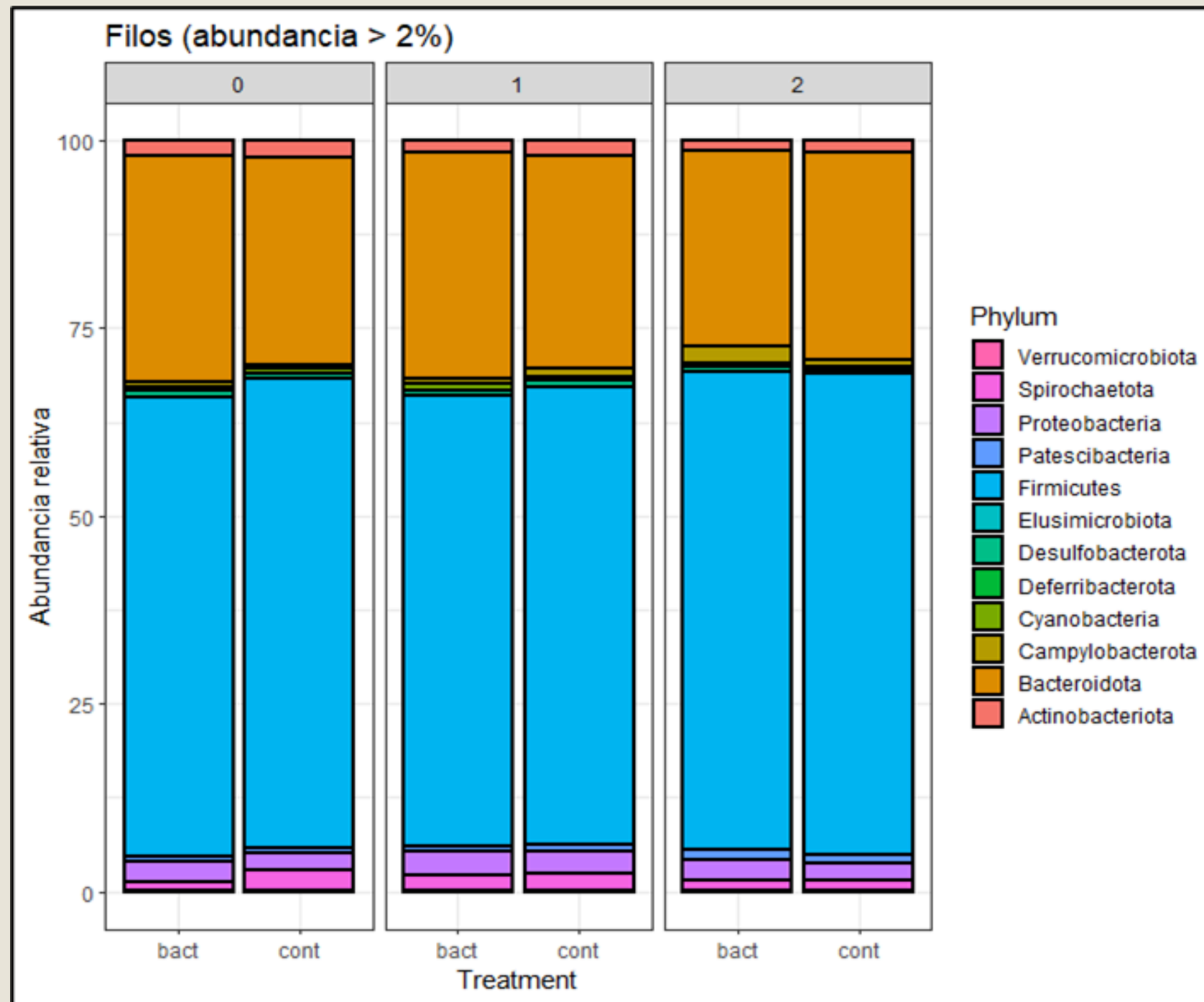
El consumo de la cepa LPB145 redujo significativamente la inmovilidad en el test de nado forzado. Lo cual se asocia a un efecto tipo-antidepresivo (Yunes *et al.*, 2020)

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

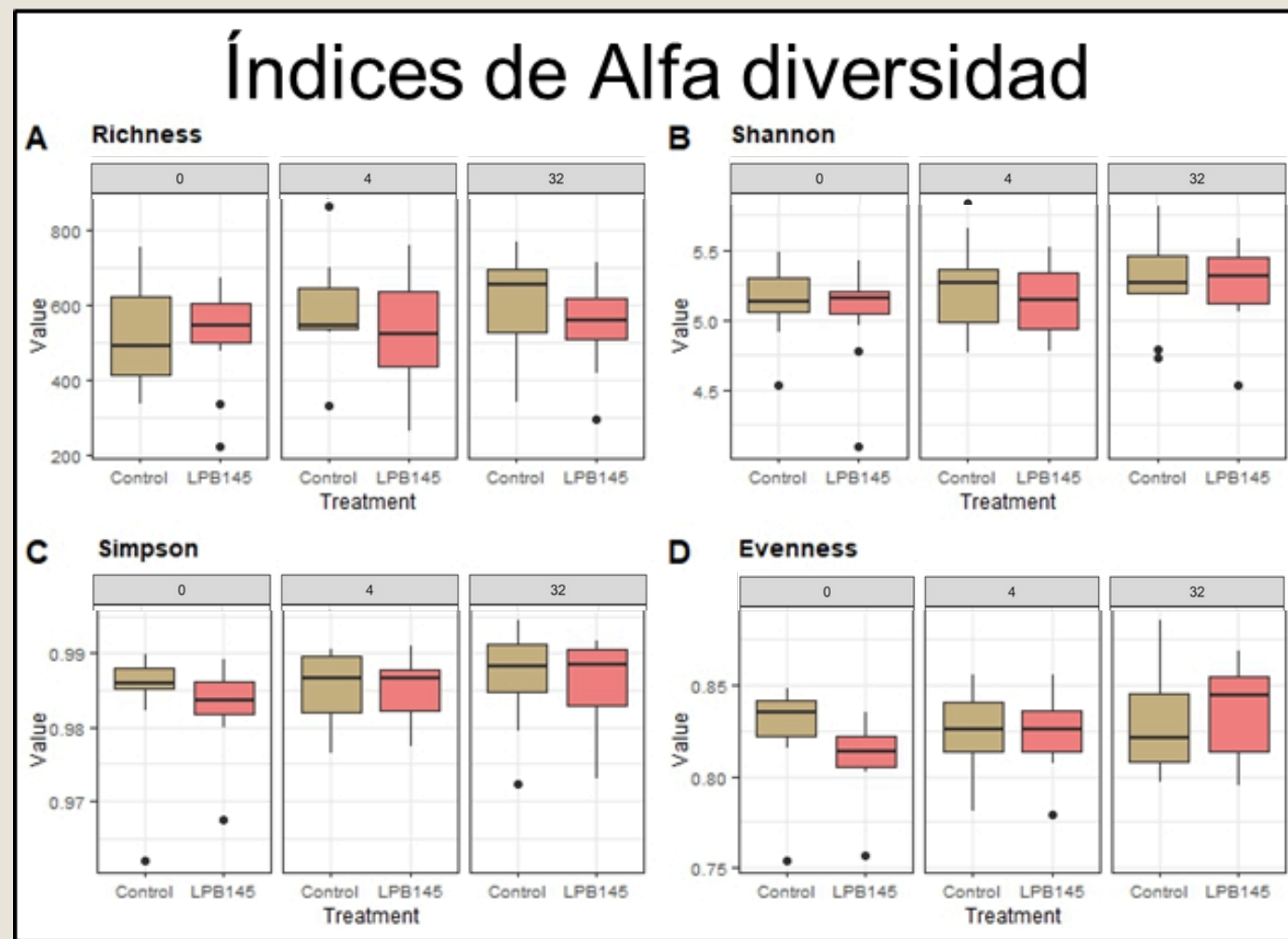
Análisis de la MI de los animales de experimentación



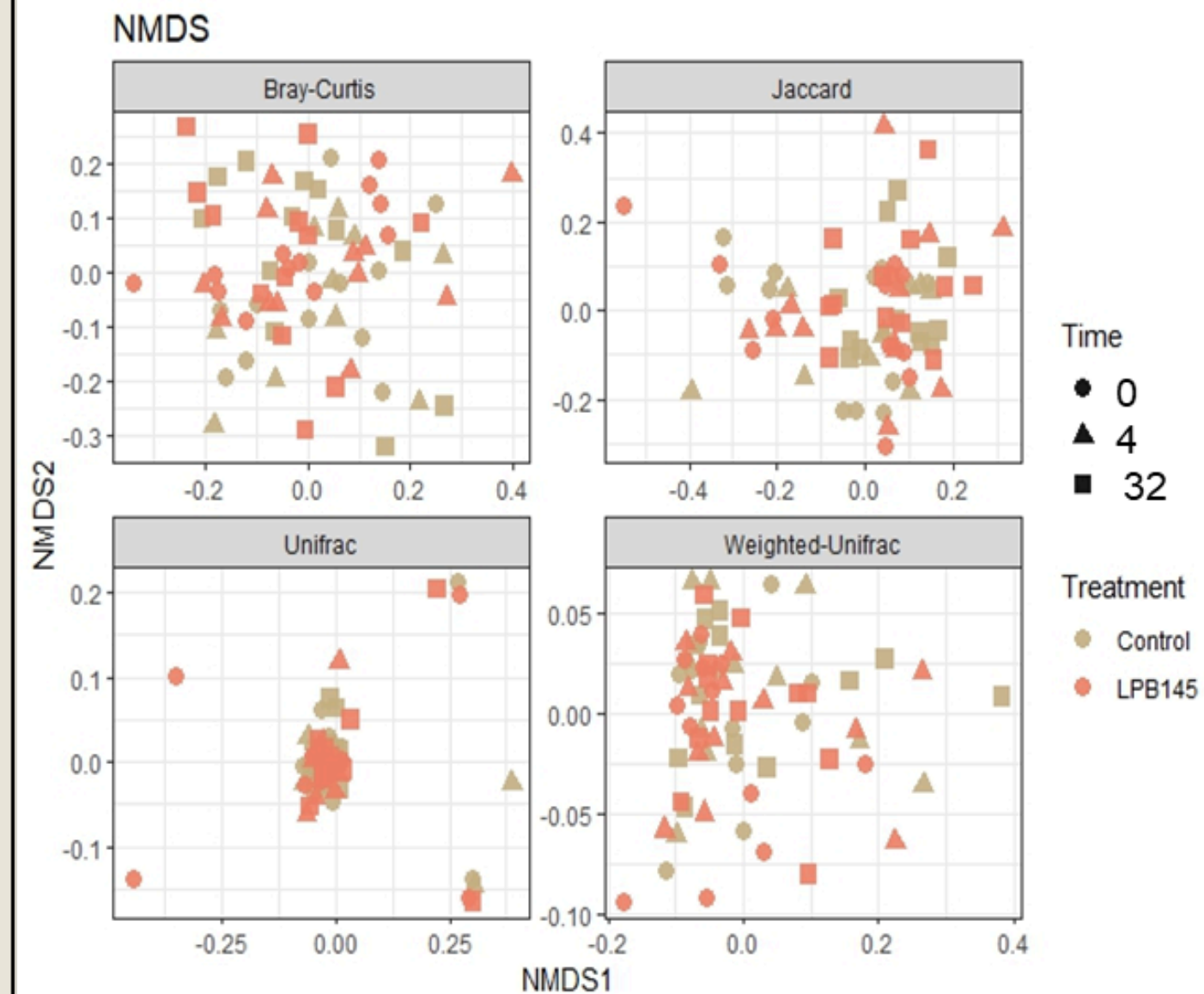
No se observaron cambios significativos en las poblaciones bacterianas a nivel de filo entre tratamientos.

Análisis de la MI de los animales de experimentación

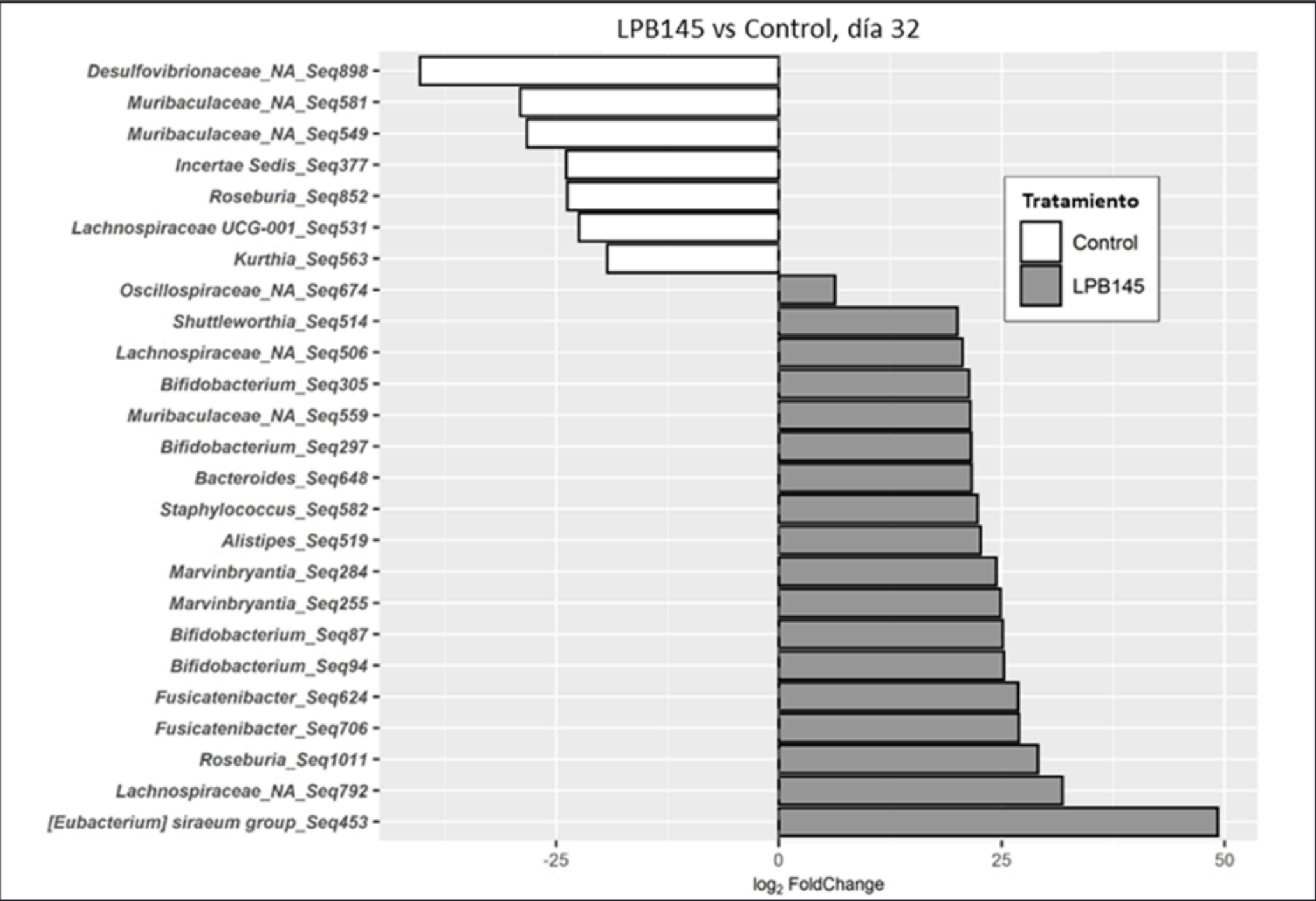
No hubo cambios en la diversidad alfa o distribución de las poblaciones bacterianas entre el grupo tratado y el grupo control.



Análisis multivariado por Escalamiento multidimensional no métrico NMDS

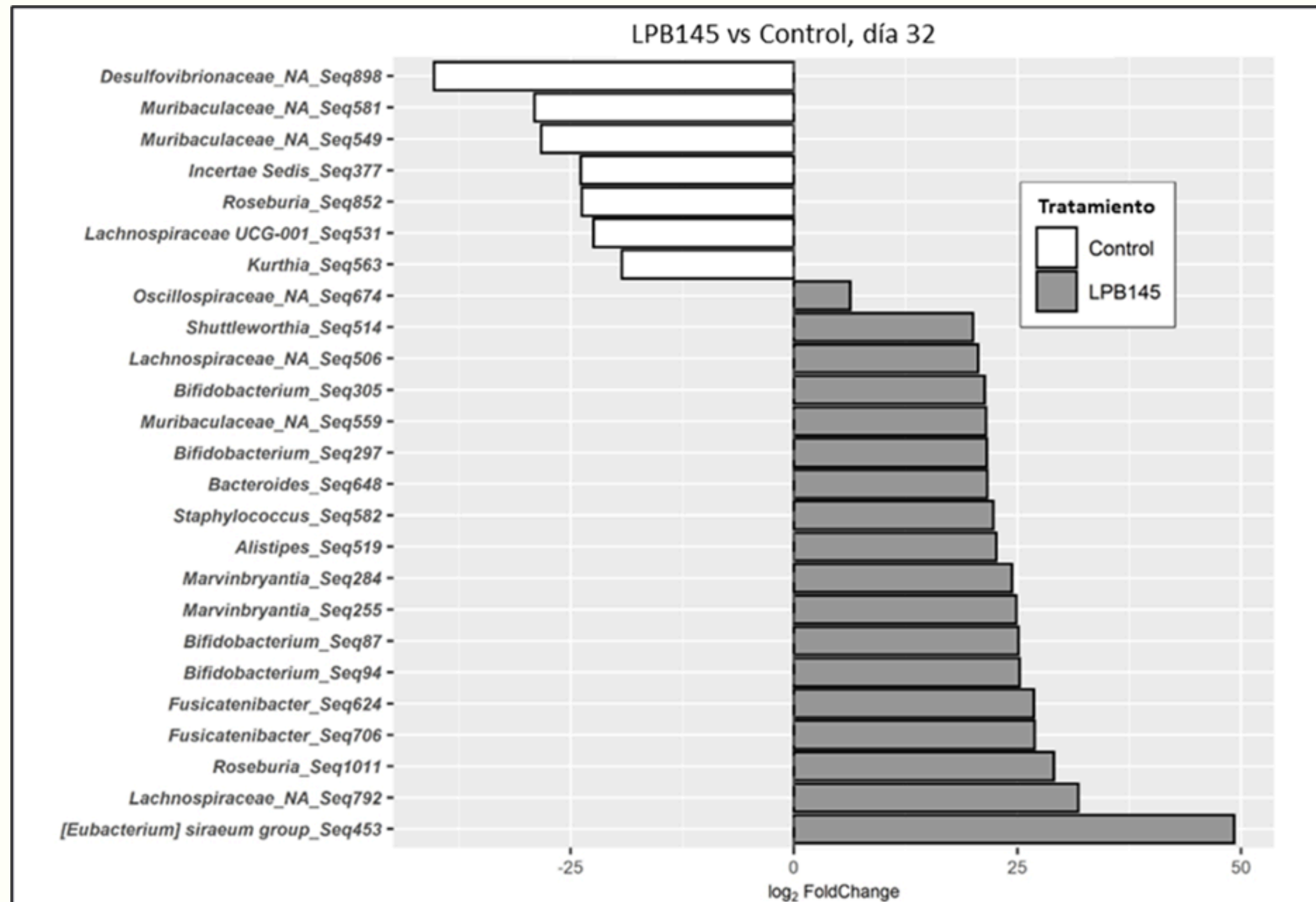


Cambios en la abundancia relativa de taxones



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.

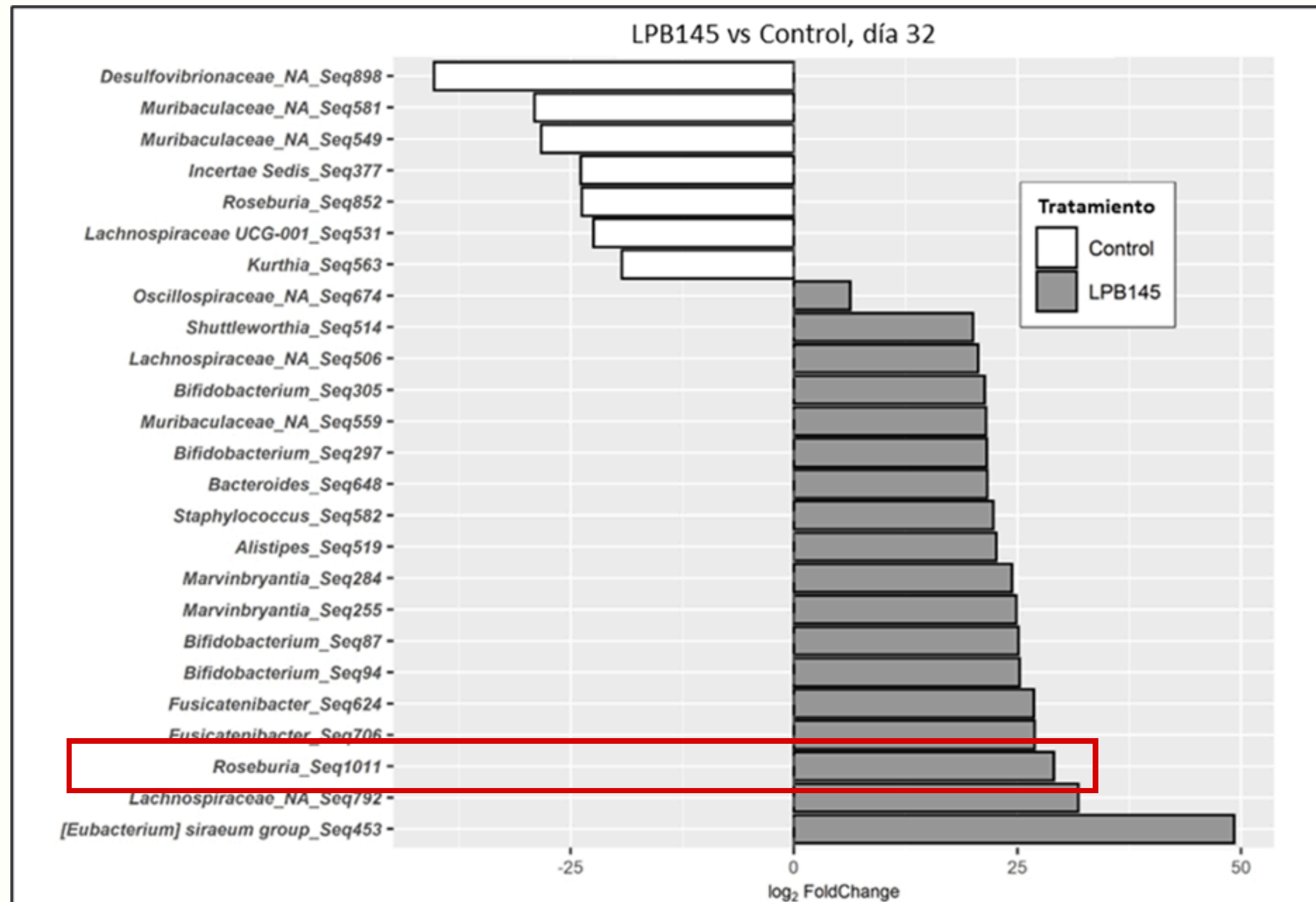
Cambios en la abundancia relativa de taxones



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

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







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

 **biomedicines**



Article

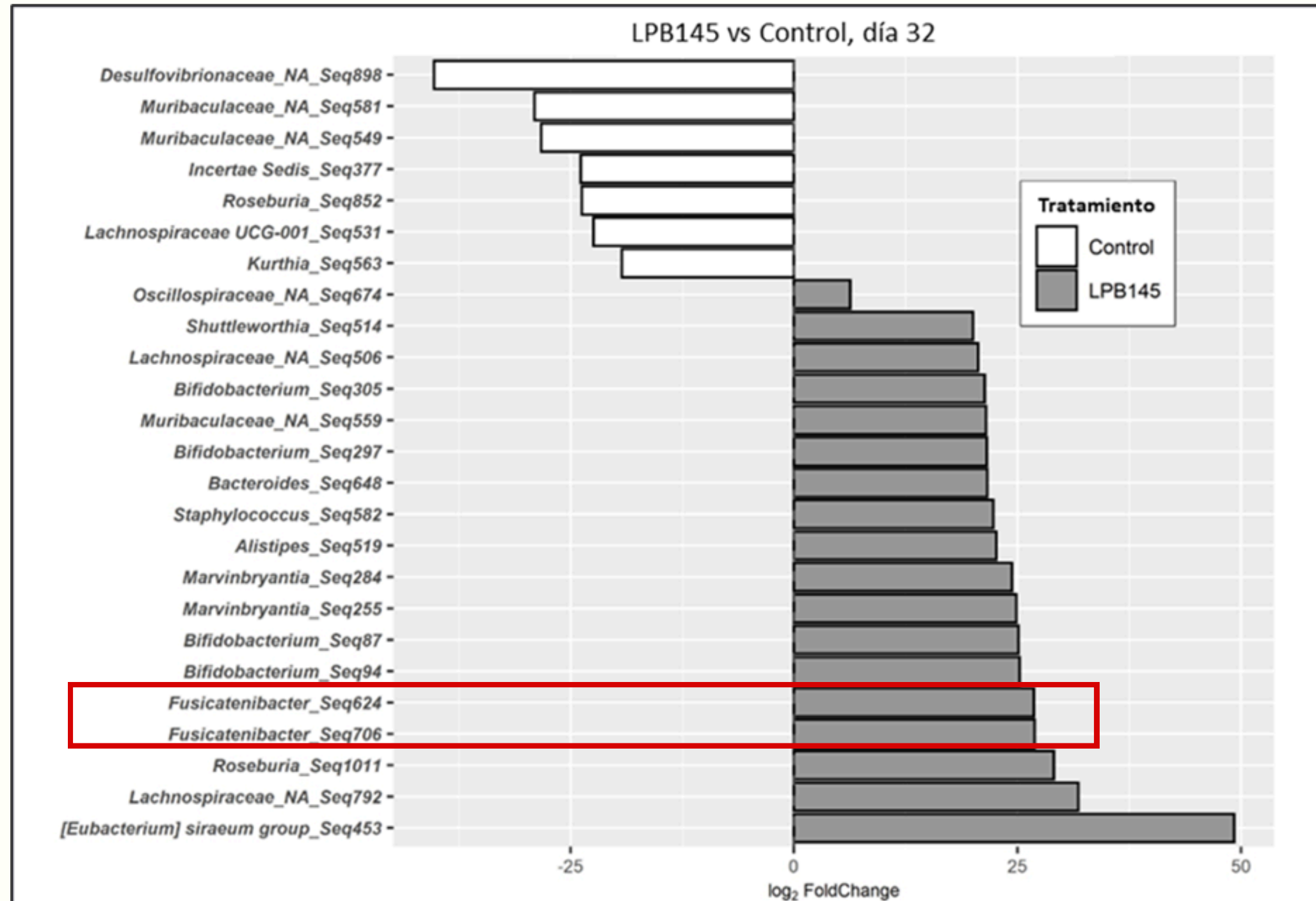
Alterations of the Composition and Neurometabolic Profile of Human Gut Microbiota in Major Depressive Disorder

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

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



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/ij.s.0.045823-0



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

Toshihiko Takada, Takashi Kurakawa, Hirokazu Tsuji and Koji Nomoto

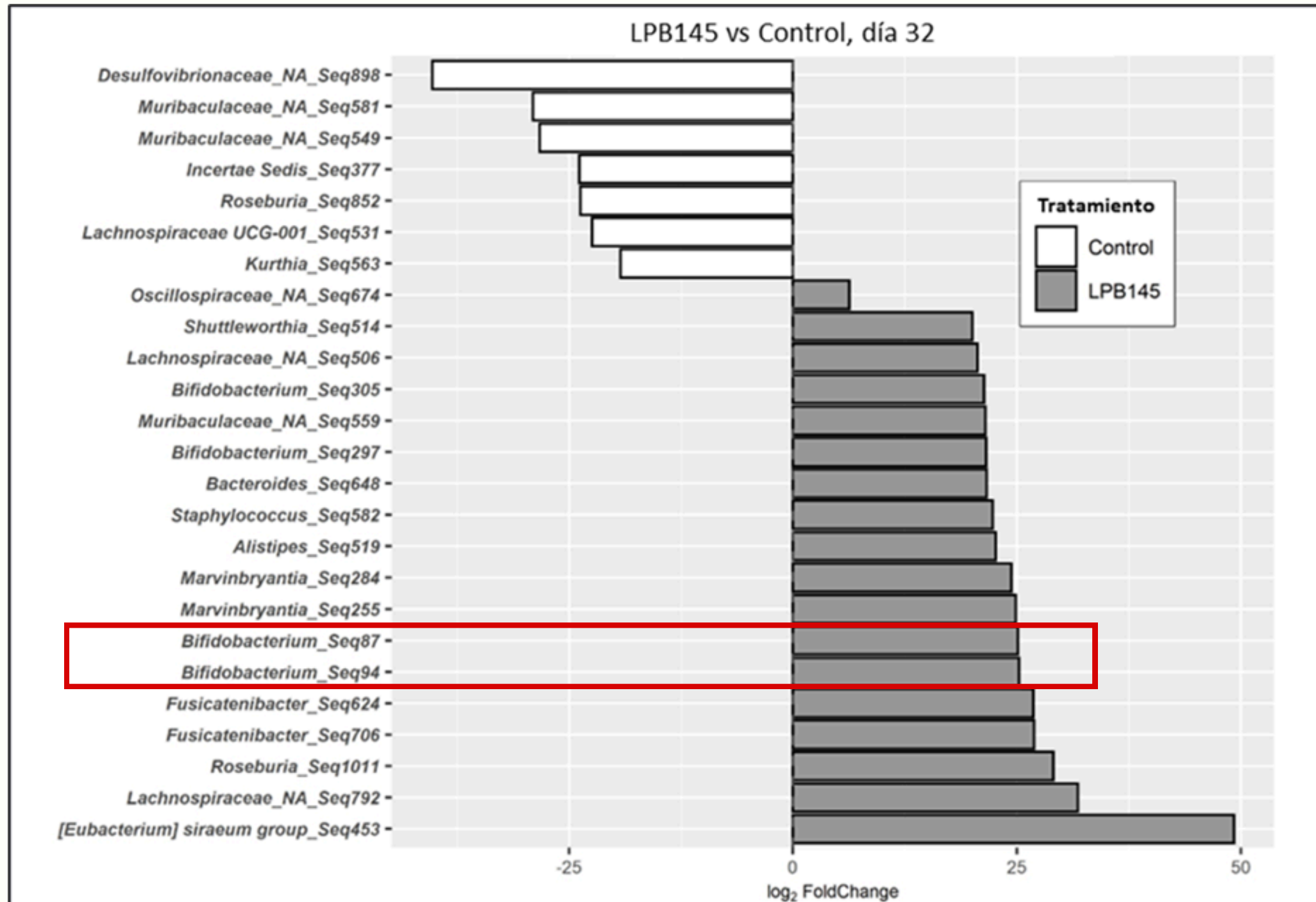
Yakult Central Institute for Microbiological Research, 1796 Yaho, Kunitachi, Tokyo, 186-8650, Japan

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

1152 ARTICLE

Open

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

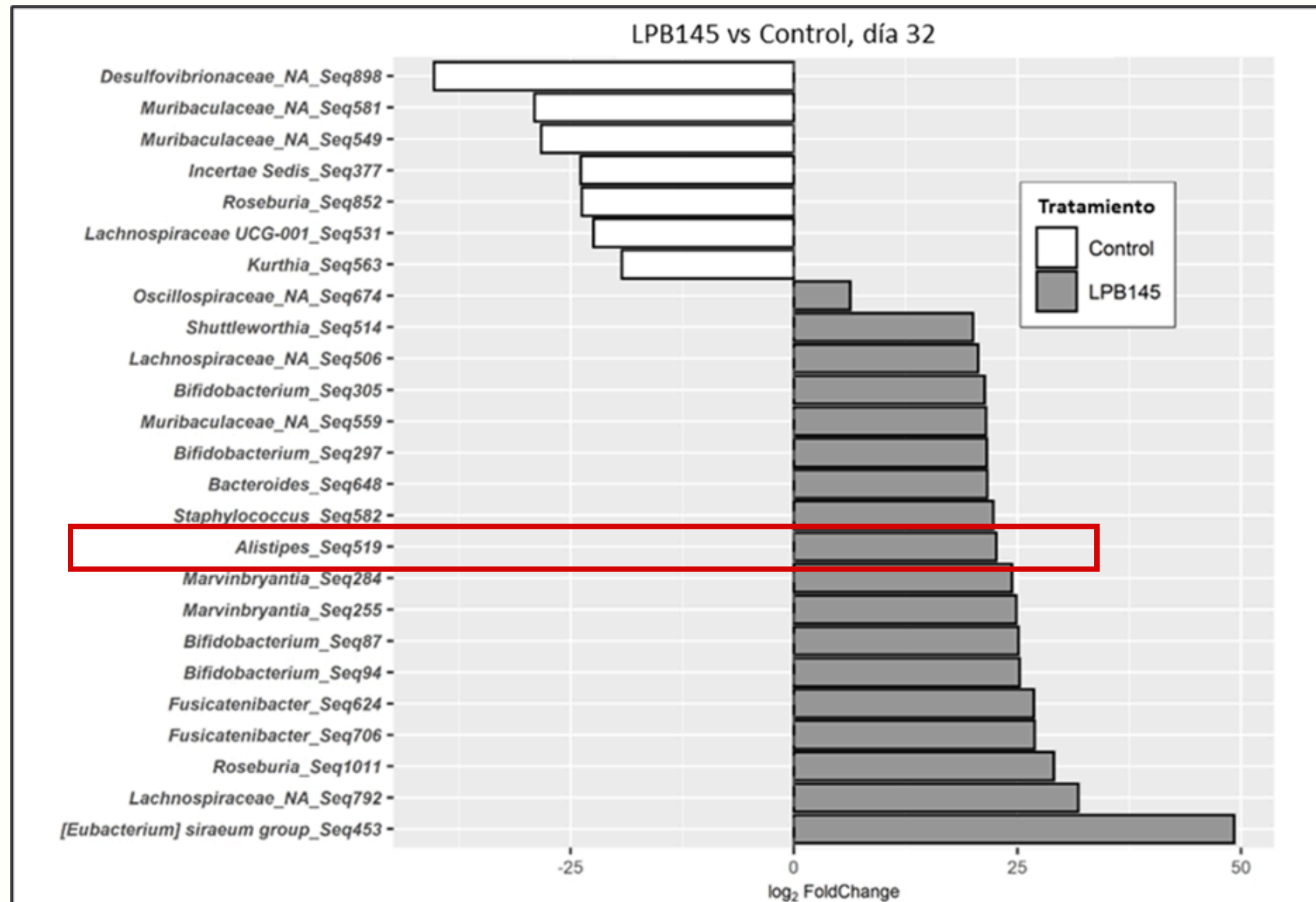
Huiying Wang, PhD^{1,2,3}, Christoph Braun, PhD^{2,4}, Eileen F. Murphy, PhD⁵ and Paul Enck, PhD¹

COLON

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

LPB145 vs Control, día 32

Desulfovibrionaceae NA Seq898 -

Catalyst, Volume 3, Issue 1, 2019

***Alistipes*: The influence of a commensal on anxiety and depression**

Gurleen Dhaliwal¹

¹Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, McMaster University, Canada

*Corresponding author: dhali1@mcmaster.ca



Fluoxetine-induced alteration of murine gut microbial community structure: evidence for a microbial endocrinology-based mechanism of action responsible for fluoxetine-induced side effects

Mark Lyte^{1,*}, Karrie M. Daniels¹ and Stephan Schmitz-Esser^{2,*}

¹Department of Veterinary Microbiology and Preventive Medicine, Iowa State University, Ames, IA, United States of America

²Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, IA, United States of America

*These authors contributed equally to this work.

[Eubacterium] siraeum group_Seq453 -

-25

log₂ FoldChange

25

50

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



Caudia Piccini



Álvaro González



Marcela Martínez



Jessika Urbanavicius

