

TITULACIÓN INTEGRAL CON EL PRODUCTO

TESIS

“SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO GAMMA-AMINOBUTÍRICO AISLADAS DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA

BELTRÁN CASTRO JOSÉ ANTONIO

SINALOA DE LEYVA, SIN.

FEBRERO, 2017.

DEDICATORIA

De todo corazón a Dios por permitirme vivir esta gran etapa de mi vida, que siempre supe se llegaría, a mi madre María del Refugio Castro Gámez mi más grande cómplice y fiel amiga gracias por ser como es la amo con todas mis fuerzas, sin usted no sé que haría, a mi padre Ramón Beltrán Cortez gracias por todo y tolerarme tanto, a mis Hermanos Rito y Verónica, Bruna, Guadalupe, María Lidia y Ramón, Exiquio, Ramona y a mi gran tesoro chiquito que vino a darle alegría y luz a mi vida Marian te adoro corazón, a mis sobrinas Adryeli, Lupita, Lidia, Mariali, Jarol, Manuelita, Isabel y Rafaela, a mi gran hermano del alma Marcos Peraza, por su incondicional apoyo que aun estando lejos, siempre estuvo a mi lado gracias por tanta paciencia, pero sobre todo por el gran cariño y la confianza que has depositado en mí, todos ustedes han sido mi motor para salir adelante pero sobre todo mi mayor inspiración y fuerza, porque este gran logro sin ustedes no lo hubiera sacado adelante también es de ustedes , los amo con todo mi ser, Diosito me los bendiga y preste por mucho tiempo más.

AGRADECIMIENTOS

De nueva cuenta a Dios por ser el padre que siempre me escucha y guía, por otorgarme licencia de llegar a esta etapa de mi vida, por brindarme todas las bendiciones otorgadas en el transcurso de este tiempo.

Mis más profundos agradecimientos a la casa de estudios que me aceptó como un miembro más de su primera generación, el Instituto Tecnológico de Sinaloa de Leyva, gracias por darme la oportunidad de culminar mis estudios de Licenciatura.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., en especial al laboratorio de Calidad y Autenticidad de los alimentos, Química y Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA) por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.

Al Dr. Aarón Fernando González Córdova, mi director de tesis por su apoyo, y confiar en mí, para la realización de esta investigación, sin su apoyo nada hubiese sido posible, “muchas gracias”.

A la Dra. Belinda Vallejo Galland, por las sugerencias y valiosa participación en el desarrollo del presente trabajo. Gracias por el apoyo, las facilidades brindadas y sus aportaciones.

Al M.C. Ricardo Reyes Díaz por el apoyo técnico y sugerencias al presente trabajo.

Al Dr. Adrian Hernández Mendoza por sus valiosas aportaciones en la fase experimental en el presente trabajo.

A la M. C. Trinidad López Armenta por mostrarse siempre accesible, por sus valiosos comentarios y su apoyo en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Norma Alicia Rodríguez Macías, por su apoyo en la revisión del presente documento y todas sus aportaciones.

A la M.C. Gloria Alicia Norzagaray Cervantes, por su disposición, consejos y apoyo en la revisión del presente documento y aportaciones.

A la M.C. Aline Reyes Díaz, por el apoyo técnico en la revisión del documento, por sus valiosas aportaciones, comentarios, sugerencias y observaciones a lo largo del proceso de escritura y redacción del escrito.

A M.C. Alejandro Santos por el apoyo técnico y enseñanza en el desarrollo de las pruebas microbiológicas.

A M.C. Isidro Méndez, por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas y consejos gracias por todo.

A la IAI Roció Hernández Mendoza por todo el apoyo técnico y sugerencias en el presente trabajo.

A Roselia Sánchez, por el apoyo técnico en el desarrollo de las pruebas microbiológicas.

A Alejandro Epigmenio, por el apoyo técnico en la realización de pruebas microbiológicas.

A la M.C. Lourdes López Santiago por el apoyo técnico y enseñanza en el desarrollo de pruebas microbiológicas.

A la IB Carmen Manzanares, por compartir sus conocimientos y consejos.

A mis compañeros de la planta piloto de lácteos, José Hernández, Miguel Rendón, Ángeles de la Rosa, Magdalena Leandro, Wendy Cortez, Oscar Palacios, Blanca, gracias por permitirme compartir esta etapa con todos ustedes.

A mi grupo de liturgia Rita Laura, Maribel Ramírez, Norma Gaxiola, Rosario Armenta, Olga Nieblas, Gabi López, Sobeida Castro, Antonio Machado, Xóchitl Castro, Olaya López, gracias por todo el apoyo desde siempre.

A mi familia en U.S.A, gracias por todo el apoyo brindado en todo este tiempo desde el inicio de mi carrera hasta este momento de culminación Silvia eres otra madre para mi, Tania, Yanet, Yamilet, Itzamar, Daphne son mis alegrías, Fredy, Yari, Alma Lucia y familia, Ada, Tía manuela gracias por su disponibilidad, a todos les debo un poco de lo que he logrado.

A mi familia en Hermosillo, Rosa gracias eres un ángel mas en vida, Emidio fuiste como mi segundo padre, Yessika gracias por toda la confianza, Enrique, Christian, Vianney, Karely, Mónica gracias por regalarme todo ese tiempo, Francisco por ser una gran persona y tu gran corazón te portaste de lo mejor, Ramón, Lizbeth, Dulce ya que sin su apoyo no hubiera podido realizar este trabajo de tesis, gracias por entenderme en momentos de estrés.

CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. EL QUESO.....	3
2.1.1. HISTORIA DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS.....	3
2.1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA	5
2.1.3. PROCESO DE ELABORACIÓN	5
2.2. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL).....	7
2.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS BAL	7
2.2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS BAL	8
2.2.3. APLICACIÓN DE LAS BAL EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA Y PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES.....	9
2.3. ÁCIDO GAMMA-AMINOBUTIRICO (GABA).....	10
2.3.1. GABA: GENERALIDADES.....	10
2.3.2. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE GABA	11
2.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE GABA SOBRE EL SNC.....	12
2.3.4. BAL PRODUCTORAS DE GABA.....	13
2.3.4. MÉTODOS PARA DETERMINAR GABA.....	14

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
IV. JUSTIFICACIÓN.....	18
V. HIPÓTESIS	19
VI. OBJETIVOS	20
6.1. OBJETIVO GENERAL	20
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	21
7.2. REACTIVACIÓN DE CEPAS	21
7.3. ENSAYO ÁCIDO GLUTÁMICO DESCARBOXILASA	22
7.4. IDENTIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA	22
VIII. RESULTADOS	23
8.1. ENSAYO ÁCIDO GLUTÁMICO DESCARBOXILASA	23
8.2. IDENTIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA	25
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
X. CONCLUSIONES	30
XI. RECOMENDACIONES.....	31
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
XIII. ANEXOS.....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presentación comercial del QCC.....	5
Figura 2. Esquema proceso de elaboración del QCC.....	6
Figura 3. Sinapsis GABAérgica.....	13
Figura 4. Descarboxilación del ácido glutámico.....	15
Figura 5. Ionización de verde de bromocresol.....	16
Figura 6. Vires de coloración.....	16
Figura 7. Gráfico del porcentaje de BAL con actividad de la enzima GAD.....	23
Figura 8. Microfotografía de <i>Enterococcus durans</i> (100X).	25
Figura 9. Crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> sobre agar Chomocult.....	26
Figura 10. Preparación de materiales.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 11. Preparación de materiales.	¡Error! Marcador no definido.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características importantes de algunas BAL.	8
Tabla 2. Cepas aisladas e identificadas de Queso crema de Chiapas	42
Tabla 3. Presencia de la enzima GAD en cepas de BAL	43

RESUMEN

El Queso Crema de Chiapas es un producto lácteo artesanal, tradicional y emblemático de varios municipios de este estado. Su elaboración no incluye la pasteurización de la leche y agrega la adición de cuajo para obtener la masa blanda de este producto alimenticio. La microbiota presente en la leche que se utiliza para su elaboración tiene una función de gran importancia, pues de ésta dependen las características organolépticas (aroma, sabor y textura, entre otros) que diferencian a este queso de otros. Los antecedentes han mostrado que en el proceso de fermentación bacteriano durante la maduración de los quesos, se pueden generar *de novo* productos metabólicos, que no sólo son responsables de las características organolépticas de este alimento, sino también pueden mostrar propiedades benéficas a la salud. Entre estos metabolitos se ha identificado al ácido gamma aminobutírico (GABA), que ha mostrado efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) y como resultado de ello es capaz de inducir relajación y disminuir la ansiedad. Además influye en funciones fisiológicas en muchos sistemas fuera del SNC, mostrando un efecto antihipertensivo, regulación de funciones cardiovasculares, mejora de la inmunidad bajo condiciones de estrés, inhibición de metástasis en células cancerígenas, regulación de funciones en la hipófisis, producción de hormona del crecimiento, así como participación en la fertilización de mamíferos y la modulación de funciones renales. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo la identificación y selección de cepas de BAL aisladas de queso crema de Chiapas con capacidad para producir GABA. Para ello se evaluaron 38 cepas de BAL pertenecientes al cepario del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación y Desarrollo, A.C., mediante la prueba de glutamato descarboxilasa (GAD). Los resultados mostraron que todas las cepas fueron capaces de producir GABA y el grado de producción fue dependiente de la producción de enzima GAD, que a su vez fue cepadependiente.

I. INTRODUCCIÓN

El Queso crema de Chiapas (QCC) proviene de la región norte del mismo estado, aunque existen versiones de su elaboración que mencionan a otras regiones convirtiendo al QCC en un producto tradicional, emblemático del estado de Chiapas, elaborado en varios municipios, reconocido en la entidad y algunas ciudades de otros estados (Villegas *et al.*, 2011a). En un principio, su elaboración fue una actividad finquera para autoabastecimiento de haciendas con grandes hatos de ganado. El procedimiento se adecuó a condiciones de producción como la ordeña una vez al día, reposo de leche para desnatarla, utilización de cuajo, corte de cuajada con cuchillo, manteado en bolsa de tela, prensado con piedras o madera, empacado y manejado en hojas de plátano (Cervantes *et al.*, 2008). Por su elaboración artesanal, la leche no se pasteuriza y la cuajada se forma por el cuajo añadido (Torres-Llanez *et al.*, 2006).

Los primeros estudios con este producto fueron dirigidos a la investigación de la microbiota presente en este alimento, responsable de las propiedades organolépticas del mismo. Se ha reportado que en cultivos iniciadores para la elaboración de quesos predominan cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) como son *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) y algunas especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Smit *et al.*, 2005), lo que hace suponer la presencia de estas bacterias en el QCC. En un estudio realizado por Corzo. (2014), se aislaron y seleccionaron cepas de BAL del QCC, las cuales fueron caracterizadas con base en propiedades sensoriales deseadas para productos lácteos. Las cepas aisladas pertenecen a *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecium*. Aunado a la función principal de las BAL como responsables de propiedades organolépticas en productos lácteos, se ha reportado que éstas pueden generar metabolitos derivados de la fermentación bacteriana, capaces de mostrar beneficios a la salud una vez consumido el alimento que lo contiene (Topisirovic *et al.*, 2006). Entre estos metabolitos destaca el ácido gamma-aminobutírico (GABA), que es producido por la descarboxilación del ácido glutámico por acción de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Buddhala *et al.*, 2009). GABA desempeña un papel fundamental como neurotransmisor en el SNC y tejidos periféricos (Jin *et al.*, 2013). Se ha demostrado también su participación en la

disminución de la presión arterial (siendo éste uno de los efectos más estudiados) en animales y seres humanos, así como en mecanismos cardiovasculares (Marina *et al.*, 2014; Cabeza *et al.*, 2008). También se ha reportado que GABA es una molécula inmunomoduladora efectiva que puede inhibir la metástasis de células cancerígenas (Adham *et al.*, 2006). Aunque GABA existe naturalmente en muchos tipos de alimentos en niveles bajos, se ha reportado que puede producirse en altas concentraciones por ciertos tipos de BAL (Adham *et al.*, 2006). Lo anterior, en adición a la necesidad de obtener un mayor conocimiento sobre los beneficios que el QCC puede brindar al consumidor, así como el aporte a la ciencia en la mejora de la salud a través de la alimentación, da lugar a la búsqueda e identificación de cepas nativas del QCC capaces de producir GABA. De manera que este estudio tiene como enfoque principal la selección de cepas de BAL productoras de GABA, derivadas del QCC.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. EL QUESO

La norma oficial mexicana (SSA, 2010) define al queso, como: “Producto elaborado de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado”.

Desde el punto de vista de su composición, el queso puede definirse como un producto fermentado o no, obtenido por coagulación de la leche en forma de gel más o menos deshidratado que retiene toda la materia grasa si se trata de un queso graso, un poco de lactosa en forma de ácido láctico y una fracción variable de sustancias minerales (Veisseyre, 1988). Es una de las formas más eficientes para preservar la leche en un producto que se conserva bien; menos voluminoso al contener menos agua, de alto valor nutritivo, sabroso y de fácil digestión. Los pasos fundamentales en su elaboración son la coagulación de la leche, el cortado de la cuajada, eliminación del suero, salado, prensado y en algunos casos la maduración (Badui, 1999). Gran parte del agua y otros componentes solubles de la leche (v.g. la lactosa y minerales hidrosolubles) se separan con el suero (Kindsdtedt, 2005).

2.1.1. HISTORIA DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS

La elaboración del QCC tiene una antigüedad de entre 70 y 80 años, aunque hay versiones que argumentan podría tener más de 120 años y abarca cuatro regiones en el estado de Chiapas (Villegas *et al.*, 2004).

El proceso de elaboración del QCC en la región norte inició como una actividad finquera, principalmente dirigida al abasto de grandes haciendas ganaderas poseedoras de numerosos hatos de ganado, que obtenían grandes cantidades de

leche, principalmente durante la temporada estacional de lluvias. La elaboración del QCC en la región selva se adjudica a la influencia española, tras haber enseñado a los pobladores locales la elaboración del QCC y adaptar el proceso a condiciones medioambientales, recolectando la leche de lugares aledaños a la región aumentando con esto su producción y estimular la aparición de nuevas queserías artesanales (Villegas *et al.*, 2011a). La región centro hace referencia a ciertos propietarios finqueros alemanes asentados en esta área del estado, al transmitir los conocimientos de elaboración a sus administradores para manufacturar este producto, el cual logró difundirse y arraigarse en la región. En esta región el producto estaba dedicado al autoabasto y al comercio (Villegas *et al.*, 2004). La elaboración del QCC en la región costa se adjudica a una familia, quienes se apoyaron en un libro procedente de Holanda traído por el jefe de esta familia a México, que a su vez contó con el apoyo de un quesero empírico. De igual forma se hace mención a otro personaje habitante de esta zona, tras haber financiado una quesería, con el apoyo de un maestro quesero originario de la región (Villegas *et al.*, 2011a).

Cada una de estas versiones coinciden en el aprovechamiento total de la leche en su producción para el autoabasto y distribución en forma de queso, el cual fermentaban con “cuajo” obteniendo una cuajada de leche cruda, dándole un valor agregado al generar un producto con una vida de anaquel por un tiempo más prolongado (Ramos *et al.*, 2009). El QCC pertenece al grupo de quesos de pasta blanda desmineralizada, fresca, prensada, cuajada mixta (ácido-enzimática), leche cruda de ganado con doble propósito con un pH de 4.7 a 5.8, contenido en sal de 5 a 7 % y con una presentación en forma de prisma rectangular envuelto en papel celofán rojo o amarillo (Figura 1) y peso de 500 a 1000 g (Villegas, 2008, Romero-Castillo *et al.*, 2009).



Figura 1. Presentación comercial del QCC. (Rangel, 2011).

2.1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA

Las distintas regiones del estado de Chiapas cuentan con numerosos hatos de ganado; sin embargo, los excedentes de producción en época de lluvias, el poco consumo de leche en el trópico y la escasa adquisición del consumidor potencial llevaron a los productores de leche a la tarea de conservar este alimento. Para ello fue necesario aplicar el conocimiento empírico y utilizar algunos de los medios de conservación más antiguos de la historia: la fermentación y la sal, dando lugar a la elaboración del queso; de esta manera, se asegura un valor agregado a este alimento y a su vez se genera empleos a las comunidades de la región y ganancias a los queseros (Villegas, 1993; Villegas *et al.* 2011a). Actualmente el queso crema tropical tiene gran aceptación en el sureste de México, principalmente si proviene de Chiapas o Tabasco (Ramos *et al.*, 2009).

2.1.3. PROCESO DE ELABORACIÓN

Los pasos en el proceso de elaboración del QCC se describen de acuerdo a Rangel, (2011), expuesto en el diagrama de flujo de la figura 2.

-Maduración de la leche. Reposo de la leche cruda de 3 a 5 h. A temperatura ambiente (20 a 38 °C) para la multiplicación de la microflora natural y para descremar parcialmente por flotación.

-Reposo de la cuajada. Se deja reposar de 14 a 24 h. a temperatura ambiente (20 a

38 °C), buscando una cuajada ácida altamente desmineralizada.

-Cortado o quebrado. Una vez cuajada la leche, al sobrenadar una delgada capa de suero, se corta la cuajada. El corte es amplio (aproximadamente 2 cm) y en ocasiones se realiza también con la mano.

-Manteado o Bolseando. La cuajada cortada se coloca dentro de una bolsa de algodón o plástico. Este paso se prolonga hasta que la cuajada deje de exudar suero.

-Amasado y salado. La cuajada seca se coloca en una bandeja de madera y es manualmente amasada, incorporando sal (NaCl) al 5-7 % según la cantidad de cuajada obtenida.

-Moldeado. Se emplean moldes de caoba rectangulares, cubiertos previamente con paños de tela y son llenados con la cuajada, presionando manualmente.

-Prensado. Los moldes son llevados a una prensa de madera rústica.

-Empacado. Una vez que los moldes salen de la prensa, los quesos son retirados de éstos, se cortan los bordes sobrantes y se dejan airear; los quesos se envuelven en papel encerado, aluminio y celofán (color rojo o amarillo).

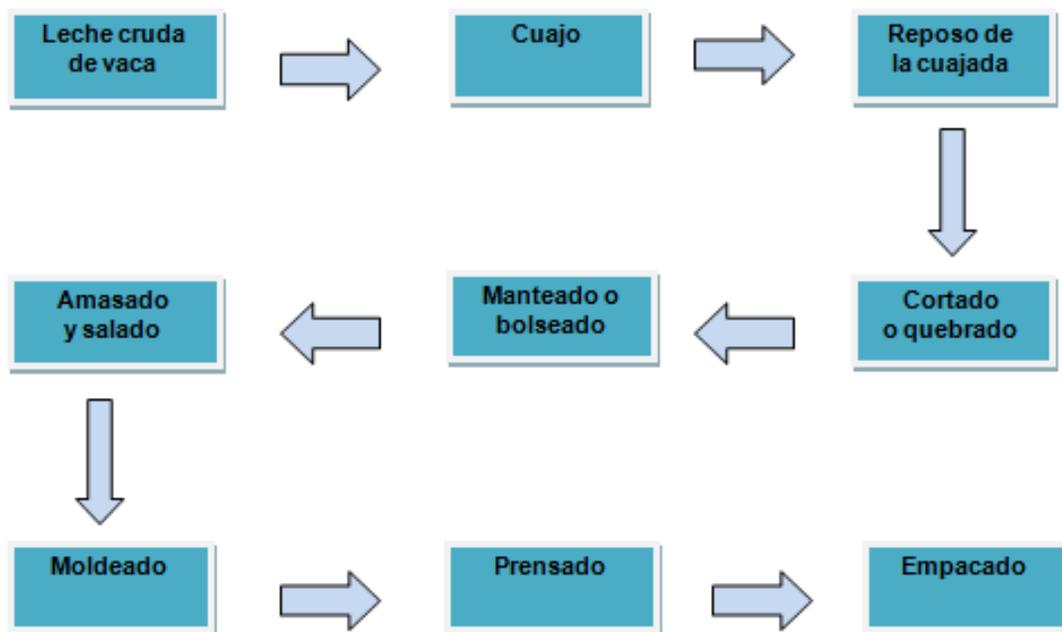


Figura 2. Esquema del proceso de elaboración del QCC. (Modificada de Villegas, 2004)

Durante la maduración del QCC la fermentación ocurre naturalmente debido a la presencia de BAL nativas de este producto. Estas bacterias son de gran importancia, ya que confieren al producto propiedades sensoriales como son: sabor, olor y textura dando a este queso su singularidad y un gran potencial comercial (Villegas, 1993).

2.2. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL)

2.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS BAL

Son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, y en forma de cocos o bastones, microaerófilas o anaerobias facultativas, catalasa negativa, con metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como mayor producto final de fermentación de azúcares vía Embden-Meyer –glucólisis y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6 fosfogluconico (heterofermentación) (Lyhs, 2002; Bedolla-Bernal, 2004). En la tabla 1 se resumen las características importantes de algunas BAL.

En términos generales, las BAL tienen necesidades nutrimentales complejas, por lo que requieren de ciertos factores de crecimiento, tales como: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones por la que abundan en un medio rico nutricionalmente como la leche (Cabeza, 2008). Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia a valores bajos de pH (pH 5) sin embargo, conforme decrece el valor de pH, un mayor número de especies resultan inhibidas (Cabeza, 2008).

Tabla 1. Características importantes de algunas BAL. Fuente Walstra *et al.*, (1999)

Características	<i>Lactococcus lactis</i> ssp.		<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> ssp	
	<i>lactis</i>	<i>Cremonis</i>	-----	<i>helveticus</i>	<i>Acidophilus</i>
Temperatura de crecimiento (°C)					
Mínima	8-10	8-10	20	20-22	20-22
Óptima	28-32	22	38	42	37
Máxima	38	37-39	50	54	45-48
Homofermentativa	-----	-----	-----	-----	-----
Heterofermentativa	-----	-----	-----	-----	-----
Producción de ácido láctico (% de leche)	0.9	0.9	0.9	2.5	1
Formación de CO ₂	-----	-----	-----	-----	-----

2.2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS BAL

Una clasificación muy útil de las BAL considera ciertos criterios de agrupamiento, como morfología, temperatura de crecimiento y la naturaleza de la fermentación (Villegas, 2004). Según su morfología se clasifican en cocos, bacilos y de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento, se clasifican en mesófilas (20-30°C) y termófilas (35-45°C) (Bertrand, 2003). De acuerdo a la naturaleza de la fermentación pueden ser homolácticas o heterolácticas. Las homolácticas u homofermentativas, degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato. Dentro de este grupo se encuentran las bacterias mesófilas *L. casei*, *L. plantarum*, *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. diacetylactis* y las bacterias termófilas *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*. Las heterolácticas o heterofermentativas degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol, CO₂ y las pentosas a ácido láctico y ácido acético. En este grupo se encuentran las bacterias mesófilas

Leuconostoc cremoris, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc brevis* (Villegas, 2004; Cabeza, 2008).

2.2.3. APLICACIÓN DE LAS BAL EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA Y PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES

Durante siglos, las BAL han sido utilizadas en fermentaciones industriales y han despertado gran atención al ser empleadas en la industria de alimentos, especialmente para la obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y producción de bacteriocinas a un bajo coste energético (Topisirovic *et al.*, 2006). Estas propiedades son muy importantes, ya que permiten elaborar productos con mejores características relacionadas con la acidificación, aroma, sabor, estabilidad y textura, influyendo en el agrado a los consumidores (Laws *et al.*, 2001; Marina *et al.*, 2003). Por ejemplo, los géneros de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* se utilizan tradicionalmente como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos como el yogur y distintas variedades de queso y bebidas fermentadas (Vuyst *et al.*, 1994).

En la actualidad, la producción de alimentos se destina no sólo a satisfacer el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios, sino también contribuyen a evitar enfermedades relacionadas con la nutrición y participar en la mejora de la salud tanto física como mental (Menrad *et al.*, 2003).

De acuerdo a la definición presentada por el ILSI Europe (por sus siglas en inglés, International Life Science Institute) en el proyecto FUFOSE (por sus siglas en inglés, Functional Food Science in Europe) un alimento será considerado funcional si ha demostrado de forma satisfactoria que afecta benéficamente una o más actividades o funciones fisiológicas del cuerpo, más allá de un efecto nutricional, favoreciendo la salud y/o reduciendo el riesgo de padecer enfermedades (Diplock, 1999). En el mercado existen alimentos funcionales que mejoran la vida de los niños encontrándose dentro de esta clasificación los prebióticos y probióticos; alimentos funcionales que reducen el riesgo de problemas de salud como el colesterol alto o la

presión arterial alta y alimentos funcionales que hacen la vida más fácil, como los productos sin lactosa o gluten (Mäkinen-Aakula, 2006).

Entre el grupo de alimentos funcionales resaltan la leche y los productos lácteos y esto se debe a la relativa facilidad para añadir componentes y conseguir que éstos se mezclen de forma homogénea; por lo tanto, se han identificado varios productos lácteos tradicionales con actividad fisiológica (Shi *et al.*, 1998; Martínez, 2008). El hecho de que los productos lácteos van más allá del efecto nutricional ordinario se debe en gran parte a la variedad de sus constituyentes como son algunas proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, carbohidratos e incluso derivados de éstos (Steijns *et al.*, 2001). Por ello, los lácteos son los que más aportaciones han hecho al mercado de los alimentos funcionales, ofreciendo una amplia gama de productos (Martínez, 2008).

Las BAL han sido utilizadas como una herramienta en la producción de alimentos funcionales, pues se ha reportado que pueden generar metabolitos derivados de la fermentación bacteriana, capaces de mostrar beneficios a la salud una vez que son consumidos (Topisirovic *et al.*, 2006). Un claro ejemplo de lo mencionado anteriormente es GABA, el cual es un metabolito derivado a partir de ácido glutámico por la acción de enzimas específicas producidas por las BAL, el cual es capaz de desempeñar un papel importante en la neurotransmisión del SNC y de tejidos periféricos (Jin *et al.*, 2013).

2.3. ÁCIDO GAMMA-AMINOBUTIRICO (GABA)

2.3.1. GABA: GENERALIDADES

GABA es un aminoácido no proteico de cuatro carbonos que actúa como un neurotransmisor inhibitorio en animales, se encuentra distribuido de forma general en bacterias, plantas y vertebrados. De igual forma se encuentra en los alimentos en cantidades reducidas de concentración y únicamente se producen en el organismo a partir del ácido glutámico aportado por la dieta (Marina *et al.*, 2014, Zhao *et al.*, 2016).

Se considera el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central (SNC) en mamíferos (Maemura *et al.*, 2002). Su síntesis es estimulada por la falta de oxígeno y la acidificación del medio (Olier *et al.*, 2004). Es producido por la descarboxilación de ácido glutámico a partir de la eliminación de un grupo α -carboxilo, por acción de la enzima GAD, que utiliza piridoxalfosfato como cofactor (Buddhala *et al.*, 2009).

Se han identificado dos isoformas de la enzima GAD; GAD65 y GAD67, con pesos moleculares de 65,000 y 67,000 Da, respectivamente (Franke *et al.*, 2005). Las dos isoformas de GAD tienen diferente localización subcelular; GAD67, que está distribuida en el citoplasma neuronal y GAD65, que está localizada en las vesículas sinápticas (Buddhala *et al.*, 2009).

2.3.2. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE GABA

En los mamíferos, GABA se encuentra en altas concentraciones en el cerebro, principalmente en el cerebelo, donde desempeña un papel fundamental en la neurotransmisión dentro del sistema nervioso central (SNC), también ha sido identificado en muchos órganos como el páncreas, pituitaria, testículos, tracto gastrointestinal, ovarios, placenta, útero y médula suprarrenal (Jin *et al.*, 2013).

Una de las funciones que se han reportado para GABA es el control del paso de impulsos eléctricos a células nerviosas, músculos y órganos. De manera que en humanos es directamente responsable de la regulación del tono muscular (Maemura *et al.*, 2002). GABA también se localiza en los islotes pancreáticos, donde probablemente esté involucrado en las funciones paracrinias (Franke *et al.*, (2005). Además, participa en la regulación de la inhibición de metástasis en células cancerígenas, la regulación de funciones en la hipófisis, la producción de la hormona del crecimiento, la fertilización de mamíferos y en la modulación de funciones renales y mecanismos cardiovasculares implicados en hipertensión. Se le ha relacionado incluso con la estabilización de trastornos del humor (Adham *et al.*, 2006; Tujioka *et*

al., 2009) y ha demostrado tener potencial para mejorar la función inmune bajo condiciones de estrés (Adham *et al.*, 2006). Aunado a lo anterior, se le han atribuido otras funciones como la relajación y prevención de la falta de sueño, insomnio y depresión (Okada *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2014).

Se ha reportado que una baja producción de GABA en el cerebro provoca enfermedades relacionadas con la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, demencia senil, convulsiones, enfermedad de Alzheimer, síndrome de persona rígida y esquizofrenia (Wong *et al.*, 2003). Okada *et al.*, 2000, demostraron que el consumo diario de germen de arroz (con una concentración promedio de 26.4 mg de GABA) es eficaz para el tratamiento de trastornos neurológicos.

2.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE GABA SOBRE EL SNC

La maquinaria de señalización de GABA está compuesta de cuatro elementos; los canales iónicos GABA A, que permiten la entrada de iones cloruro al espacio intracelular; los receptores GABA B, que son un tipo de receptores que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G; los transportadores de GABA y las enzimas que producen o degradan GABA (GAD y GABA-T, respectivamente) (Jin, *et al.*, 2013).

El mecanismo de acción de GABA sobre el SNC se muestra en la figura 3. Se sintetiza GABA a partir de ácido glutámico mediante la acción de la enzima GAD (1). Posteriormente, GABA es liberado hacia el espacio sináptico directamente o desde las vesículas que lo almacenan (2). Una vez fuera de la neurona terminal, GABA activa los receptores post-sinápticos GABA B y los canales GABA A (3) (Jin *et al.*, 2013).

GABA es producido y liberado por las neuronas activando los canales iónicos GABA A y al receptor GABA B en la membrana plasmática neuronal. La activación de los canales y el receptor da lugar a la disminución de la excitabilidad neuronal en neuronas maduras. Las neuronas recurren a la recaptura de GABA mediante cotransportadores

de GABA dependientes de sodio, cuando los niveles extracelulares se encuentran bajos (Jin *et al.*, 2013).

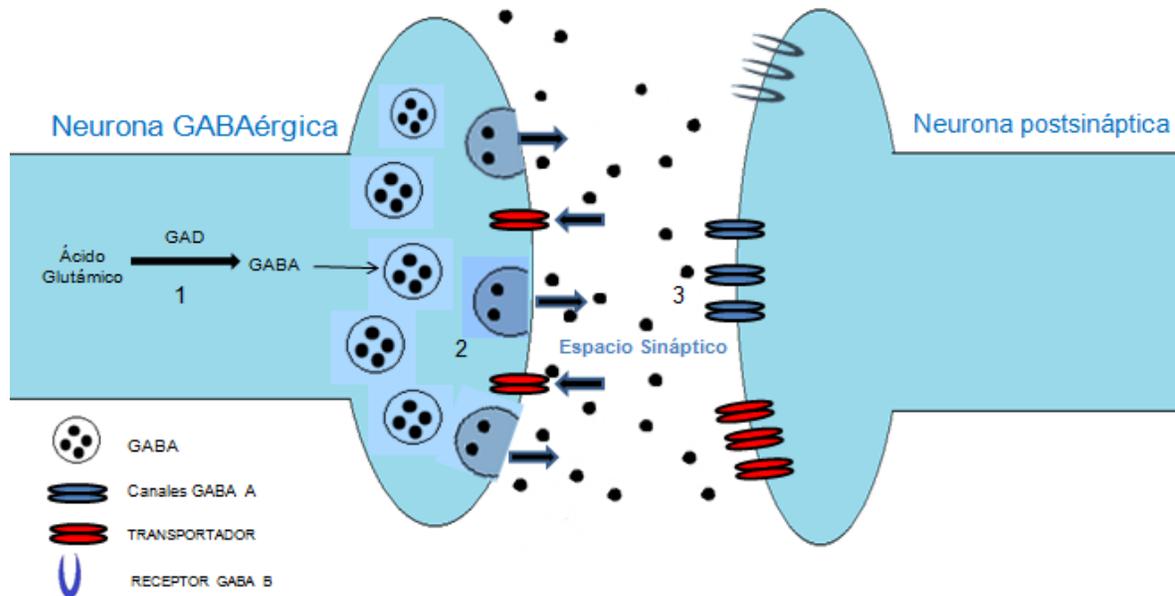


Figura 3. Sinapsis GABAérgica.

Fuente: elaboración propia.

2.3.4. BAL PRODUCTORAS DE GABA

GABA existe naturalmente en muchos tipos de alimentos en niveles bajos, mientras que en productos fermentados se han reportado niveles elevados. Por lo tanto, GABA puede producirse en concentraciones superiores por ciertos tipos de BAL (Adham *et al.*, 2006; Komatsuzaki *et al.*, 2005).

La producción de GABA por BAL es mediada por la presencia de la enzima GAD que se encuentra en el medio intracelular de estas bacterias. Se ha reportado la producción de GABA en medios de cultivo con diferentes cepas, como son *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactococcus lactis* aisladas de varios tipos de quesos, que oscilan entre 15 y 63 mg/L (Siragusa *et al.*, 2007). Park y Oh. (2005, 2007), obtuvieron 1.049 g/L de GABA empleando cepas de *Lactobacillus*. Por otra parte, Yokoyama *et al.* (2002) reportó gran

producción de 100 mg/L de GABA por *Lactobacillus brevis* aislada a partir de un queso español artesanal.

Además de lo anterior, otras investigaciones han reportado la capacidad de las BAL para producir GABA en diferentes alimentos como bebidas a base de frutas, bebidas fermentadas, yogurt, hortalizas y productos marinos. Todos ellos fundamentan su evaluación en la capacidad que tienen las cepas para producir la enzima GAD (Diana *et al.*, 2014).

2.3.4. MÉTODOS PARA DETERMINAR GABA

Actualmente existen diferentes procedimientos para cuantificar GABA como son; espectrometría de masas (EM), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), resonancia magnética nuclear (RMN), electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por laser (CE-LIF), cromatografía líquida acoplada a masas en tándem (LC-MS/MS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Dichos métodos, permiten la detección y cuantificación de GABA, así como de ácido glutámico mediante la ionización de estas moléculas (Thomas *et al.* 2012; Casados-Rios, 2014).

Además de éstos, el uso de anticuerpos contra GAD es un método que también ha sido utilizado, ya que GAD es la enzima que cataliza la transformación de ácido glutámico a GABA (Buddhala *et al.*, 2009).

De los métodos mencionados anteriormente resalta la cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas, pues es una técnica analítica ampliamente utilizada para la detección de GABA, ya que tiene gran aplicación en la investigación de mezclas complejas de compuestos orgánicos, caracterizándose por su gran sensibilidad y especificidad (Lliu *et al.* 1997). Sin embargo, el ensayo GAD es tal vez uno de los métodos de tipo cualitativo más utilizados para la identificación de GABA y esto se debe a las ventajas de esta prueba, como son su bajo costo, rapidez,

alta sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica, lo que permite ahorro de personal, de materiales y tiempo empleado en la identificación (Tsoraeva *et al.* 2005).

El ensayo GAD se basa en la conversión de una molécula de ácido glutámico en GABA y CO₂ reacción que consume un protón intracelular disminuyendo la acidez del citoplasma (Cotter *et al.* 2001), donde la reacción de conversión de ácido glutámico a GABA, elimina un grupo carboxilo a partir de ácido glutámico por acción de la enzima GAD, liberando dióxido de carbono tras la reacción (Figura 4).

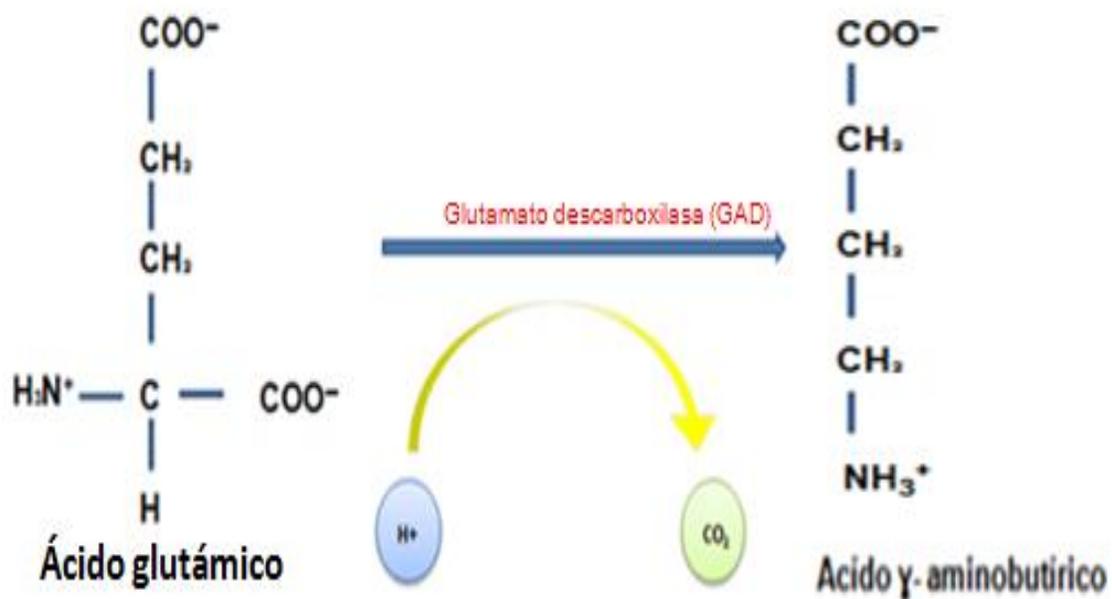


Figura 4. Descarboxilación del ácido glutámico.

Fuente: elaboración propia.

Para visualizar esta reacción se utiliza un indicador para valoración ácido-base como es el verde de bromocresol. El intervalo de transición de este indicador oscila entre 3.8–5.4 en la escala de pH, virando de amarillo a azul-verdoso. En solución acuosa, ioniza para dar la forma monoaniónica (amarillo), que desprotona a pH elevado para dar forma dianiónica (azul) (Diamond *et al.*, 2008), como se muestra en las figuras 5 y 6.

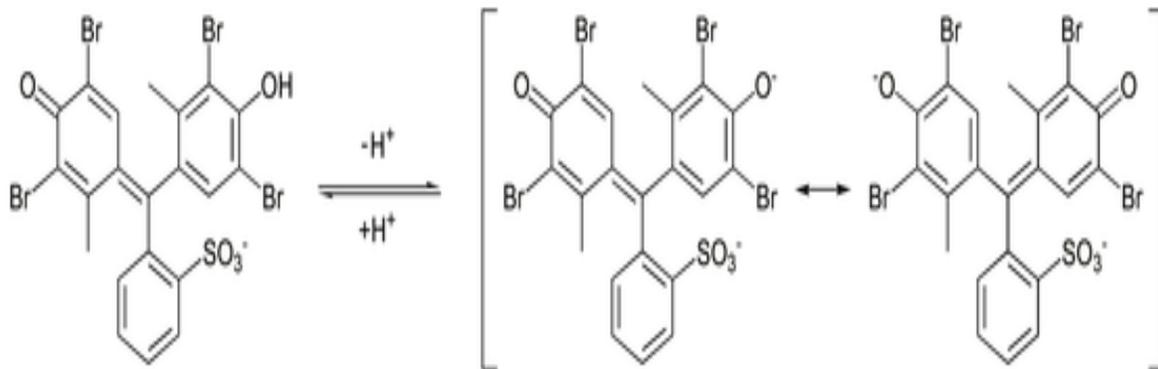


Figura 5. Ionización de verde de bromocresol (Diamond *et al*, 2008).



Figura 6. Vires de coloración (Diamond *et al*, 2008).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la industria alimenticia se ha investigado el aporte nutrimental de diversos productos lácteos, pero poco se sabe sobre su contribución fisiológica y funcional, por lo que es necesario que se realicen estudios y caracterizaciones de estos productos. La generación de nueva información en este tema no sólo permitiría el entendimiento funcional de este grupo de alimentos; sino además, se lograría una mejor calidad de vida debido a su consumo y por otro lado, permitiría a pequeños productores obtener un mayor ingreso económico, como es el caso de las queserías productoras del QCC, dado que la tasa de consumo podría verse incrementada. Debido a lo anterior, este estudio tiene como objetivo seleccionar cepas de BAL aisladas del QCC con capacidad para producir GABA, ya que la bibliografía reporta que altas concentraciones de GABA pueden producirse por ciertos tipos de BAL y dado que GABA ha demostrado diferentes efectos como son: mejora de la neurotransmisión en el sistema nervioso central y tejidos periféricos, disminución de la presión arterial en humanos y efectos inmunomodulador, antiobesogénico y antioxidante entre otros. La sola identificación de cepas productoras de GABA en el QCC enriquecería el concepto actual de este producto alimenticio en diferentes sentidos (nutricional, funcional, económico), aunque por supuesto podría generar una nueva alternativa de producción de GABA vía generación mediante microorganismos, para posteriormente ser añadido a los alimentos en concentraciones adecuadas y así crear nuevos productos con carácter funcional.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las BAL se han utilizado ampliamente en la industria alimenticia, ya que contribuyen con características organolépticas como son el olor, sabor y textura (Topisirovic *et al.*, 2006). Además se ha evidenciado que estas bacterias son capaces de aportar beneficios a la salud, extendiendo sus aplicaciones en alimentos denominados funcionales (Marina *et al.*, 2014). Durante los procesos de fermentación, las BAL liberan una gran variedad de metabolitos, algunos de los cuales son responsables de ciertas propiedades benéficas a la salud mostradas por estas bacterias. Entre estos metabolitos destaca GABA, que ha mostrado diferentes efectos como son: neurotransmisión, antihipertensivos, antiobesogénicos, antioxidantes e inmunomoduladores (DeFeudis., 1981; Wu *et al.*, 2014). GABA actúa además fuera del SNC, regulando diferentes funciones como son; cardiovascular, inhibición de células cancerígenas, regulación de hipófisis, producción de hormona del crecimiento, fertilización de mamíferos, modulación de funciones renales, y disminución de trastornos del humor (Adham *et al.*, 2006). GABA existe naturalmente en muchos tipos de alimentos en niveles bajos, mientras que en productos fermentados pueden encontrarse niveles elevados. Por lo tanto la producción de GABA en altas concentraciones puede producirse por ciertos tipos de BAL (Adham *et al.*, 2006). Aunque GABA ha mostrado un papel de importancia realizando diferentes funciones, este metabolito ha sido poco investigado para su aplicación en la industria de los alimentos, por lo que se desconoce el impacto fisiológico y funcional en el organismo, al consumirse en un alimento como es el QCC. Por esta razón surge la necesidad de identificar cepas de BAL en el QCC, capaces de producir GABA, como un primer paso para realizar investigaciones futuras enfocadas en la participación de GABA en la mejora de la salud, una vez consumido en un producto lácteo fermentado.

V. HIPÓTESIS

Las bacterias ácido lácticas del queso Crema de Chiapas son productoras de ácido gamma-aminobutírico.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Seleccionar cepas de bacterias ácido láctico aislado de Queso Crema de Chiapas con capacidad para producir ácido γ -aminobutírico.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener cultivos frescos de bacterias ácido-lácticas aisladas de Queso Crema de Chiapas.
2. Seleccionar cualitativamente cepas de bacterias ácido láctico, aislado de Queso Crema de Chipas con base en su capacidad de producir ácido γ -aminobutírico.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

El caldo y agar MRS se obtuvieron de DIFCO™ (Sparks, MD, USA). El agar Chromocult *Enterococci* Agar se obtuvo de Merck KgaA, (Darmstadt, Germany). El reactivo GAD consistió en 0.1 g de ácido L-glutámico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), el cual sirve de sustrato para la enzima GAD; 0.005 g de verde de bromocresol (JT Baker, City Of México, MX), que funciona como un indicador de pH; 0.9 g de NaCl (JT Baker, City Of México, MX) y 0.3 mL de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), los cuales actúan como agentes líticos para liberar la enzima GAD permitiendo que la reacción ocurra en un período no mayor de 4 h; todos disueltos en 100 mL de agua destilada (pH 4.0). Una vez disueltos los componentes, el reactivo preparado se esterilizó a 121 °C/ 15 min. Posteriormente se almacenó en un frasco ámbar estéril en refrigeración hasta su uso.

7.2 REACTIVACIÓN DE CEPAS

En este estudio se evaluaron 38 cepas de BAL, que fueron aisladas de Queso Crema de Chiapas y que fueron previamente preservadas en congelación (-80°C en 38% de glicerol), siguiendo la metodología propuesta por Corzo. (2014). Estas cepas forman parte del cepario del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD). Hermosillo, Sonora, México. Entre estas cepas 18 fueron identificadas en estudios previos por Corzo., 2014, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como parte del género *Enterococcus*, 6 de ellas corresponden a *E. faecium*, y 12 a *E. durans*. Se utilizó como testigo positivo la cepa *Lactobacillus brevis* NBRC12005, procedente del Biological Resource Center (NITE) de Japón, de la cual se ha reportado su capacidad para producir la enzima GAD con elevada actividad de reacción. Ésta cepa permitió establecer la concentración óptima de ácido L-glutámico para obtener el mayor rendimiento de conversión de ácido glutámico a GABA de las cepas en cuestión. Previo a cada experimento se propagaron las cepas en caldo MRS a pH 6.5. Se realizaron tres subcultivos inoculados al 1% (v/v), incubados por 24, 18 y 12 h

respectivamente a 37 °C para obtener un cultivo fresco con una concentración final de 10⁸ UFC/mL. Para comprobar esta concentración se realizó un conteo de cada cultivo mediante la técnica de vertido en placa en agar MRS, las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h.

7.3. ENSAYO ÁCIDO GLUTÁMICO DESCARBOXILASA

Para la identificación de cepas productoras de GABA se siguió la metodología propuesta por Cotter *et al.* (2001). A partir de cada cultivo fresco se obtuvo un volumen de 5.0 mL, el cual se centrifugó (5000 g a 25 °C por 20 min) y fue lavado una vez con 5.0 mL de una solución de NaCl 0.9% (w/v). Las células se centrifugaron por segunda vez bajo las mismas condiciones. Posteriormente se resuspendieron en 0.5 mL de la solución de reactivo de GAD. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 4 horas en condiciones de anaerobiosis. Posterior al tiempo de incubación, se consideró un resultado negativo cuando no hubo cambio en el color (blanco) de las muestras y positivo con baja o alta capacidad para producir GABA, cuando las muestras presentaron una coloración verde o azul respectivamente.

7.4. IDENTIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA

Las bacterias ácido lácticas que mostraron un resultado positivo en el ensayo GAD fueron teñidas por el método de Gram. Para ello se realizaron frotis de cada cultivo fresco, que fueron teñidos de acuerdo al manual de Bergey (Bergey *et al.*, 1994) y que fueron observados en un microscopio de luz visible adaptado con fluorescencia (Carl Zeiss, MicroImaging Gmth, Germany). El equipo fue calibrado de acuerdo a las especificaciones del proveedor con el objetivo 100x.

Se realizó la siembra en superficie sobre Chromocult Enterococci Agar, que es un medio de cultivo selectivo para el aislamiento, la diferenciación y recuento de *Enterococcus* en agua, productos alimenticios y otros materiales, método por el cual se confirmó la morfología de las cepas evaluadas. Para ello, a partir de cada cultivo fresco se tomó una asada y se estriaron individualmente.

VIII. RESULTADOS

8.1. ENSAYO ÁCIDO GLUTÁMICO DESCARBOXILASA

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos en el ensayo GAD, los cuales muestran que el total de las cepas evaluadas presentan capacidad para producir GABA en mayor o menor grado, lo cual fue evidente por la coloración que presentó cada muestra, una vez que fue agregada a un medio enriquecido con ácido glutámico. Se observó que el 50 % de las muestras viró de su color original (blanco) a verde mientras que el 50 % viró a azul como se muestra en la figura 7.

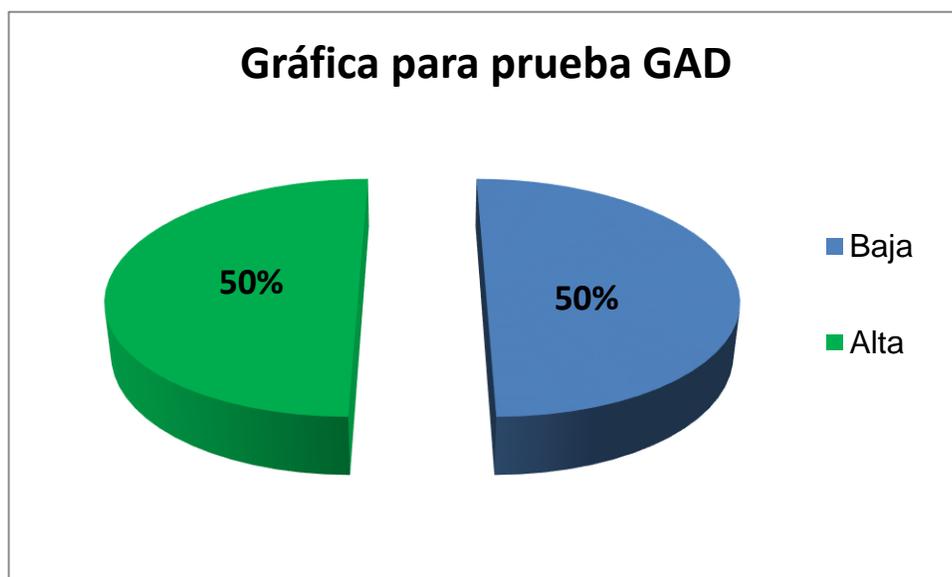


Figura 7. Gráfico del porcentaje de BAL que mostraron actividad de la enzima GAD (ensayo GAD).

Tabla 1. Cepas aisladas e identificadas y como productoras de GABA

Código de cepa	Nombre	Amarillo	Verde	Azul
1	N/I		X	
2	<i>Enterococcus durans</i>			X
3	<i>Enterococcus faecium</i>		X	
4	<i>Enterococcus durans</i>			X
5	<i>Enterococcus durans</i>		X	
6	<i>Enterococcus durans</i>			X
7	<i>Enterococcus durans</i>			X
8	<i>Enterococcus durans</i>		X	
9	N/I		N/I	N/I
10	N/I		N/I	N/I
11	N/I			X
12	N/I		X	
13	<i>Enterococcus faecium</i>		X	
14	N/I			X
15	N/I		X	
16	N/I			X
17	N/I			X
18	N/I		X	
19	<i>Enterococcus faecium</i>			X
20	N/I		X	
21	<i>Enterococcus faecium</i>		X	
22	<i>Enterococcus durans</i>			X
23	<i>Enterococcus faecium</i>			X
24	<i>Enterococcus durans</i>		X	
25	N/I		X	
26	N/I		X	
27	N/I			X
28	N/I		X	
29	N/I		X	
30	<i>Enterococcus durans</i>			X
31	N/I		X	
32	<i>Enterococcus faecium</i>		X	
33	N/I		X	
34	<i>Enterococcus durans</i>			X
35	<i>Enterococcus durans</i>			X
36	<i>Enterococcus durans</i>		X	
37	N/I			X
38	N/I			X
39	N/I		X	
40	N/I			X

Color azul – alta capacidad de producir GABA, Color verde – baja capacidad de producir GABA. Color amarillo – sin capacidad para producir GABA (en este ensayo no se observó ésta coloración) y N/I – no identificada.

8.2. IDENTIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR BACTERIANA

La tinción de Gram evidenció que el total de las cepas consideradas en este estudio, presentan forma de cocos o esférica, en grupos de dos o más, que pueden apreciarse en color rojo, indicativo de que corresponden a bacterias Gram positivas (figura 8).

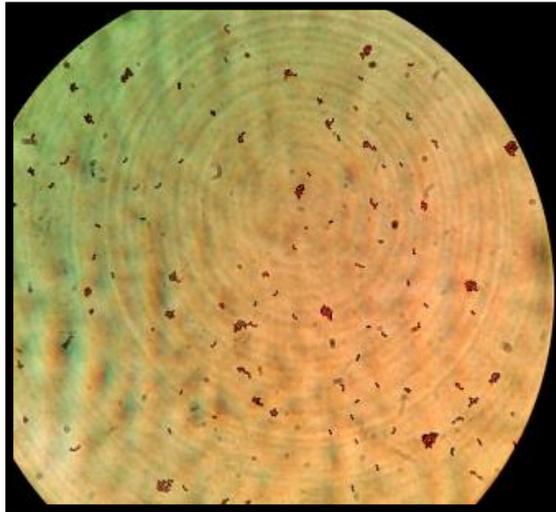


Figura 8. Microfotografía de *Enterococcus durans* (100X).

La siembra sobre Agar Chromocult confirmó el crecimiento del total de las cepas en este medio selectivo como se muestra en la figura 9.

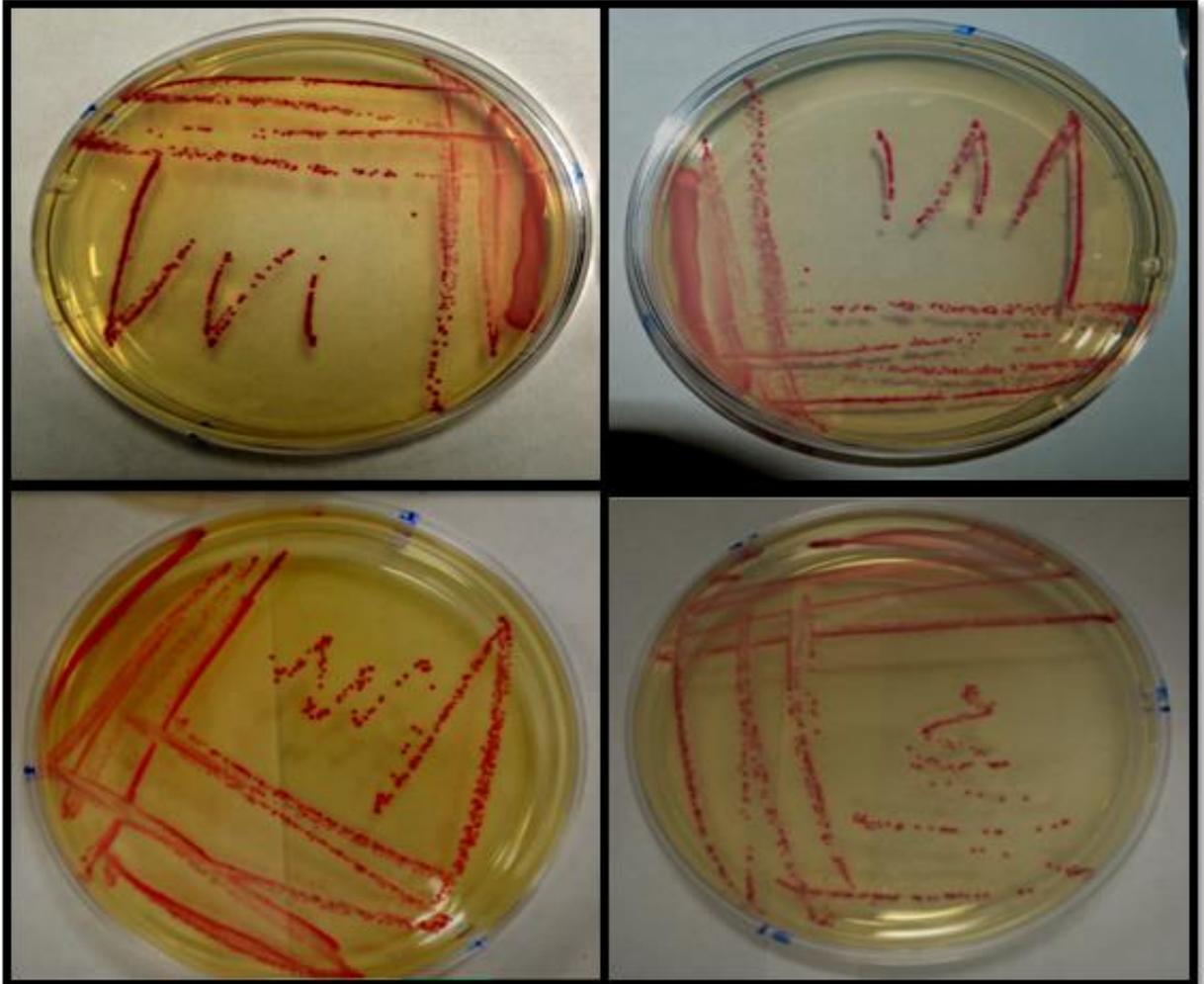


Figura 9. Crecimiento de *Enterococcus faecium* sobre agar Chromocult.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio se evaluaron diferentes cepas de BAL, todas ellas fueron aisladas del QCC y algunas de ellas fueron identificadas en estudios previos como pertenecientes al género *Enterococcus*. De las 38 cepas evaluadas, 18 fueron fenotípica y genotípicamente identificadas y 12 fueron identificadas como *E. durans* y 6 como *E. faecium*. La morfología de estas cepas fue evaluada en este estudio para comprobar la pureza de los cultivos y verificar que no estuvieran contaminados con otro tipo de bacterias y la observación por microscopía indicó que las cepas de estudio presentaban forma de cocos y en racimos de dos o más cocos, siendo característica del género *Enterococcus spp.*, lo cual coincide con lo reportado por Fischetti *et al.* (2006), para este género en específico.

El ensayo GAD, que es una prueba colorimétrica que permite evidenciar la actividad enzimática de la enzima GAD (responsable de la conversión de ácido glutámico a GABA) producida por estas bacterias y que se muestra en la tabla 1, nueve cepas de *E. durans* (2, 3, 4, 6, 7, 22, 30, 34 y 35) viraron al color azul y cuatro de ellas (5, 8, 24 y 36) viraron color verde; dos cepas de *Enterococcus faecium* (19 y 23) viraron color azul y tres de ellas (13, 21 y 32) viraron a color verde. Veinte cepas más no fueron identificadas, de las cuales ocho (11, 14, 16, 17, 27, 37, 38 y 38) viraron al color azul y doce de ellas (1, 12, 15, 18, 20, 25, 26, 28, 29, 31, 33 y 39) viraron al color verde. Según el fundamento de la técnica empleada, todos los medios de cultivo que lograron virar a color azul, verde o amarillo (o sin cambio de color), son considerados como cepas con una actividad enzimática GAD alta, baja o sin actividad, respectivamente. Lo cual a su vez, sugiere una producción de GABA alta, baja o nula en el orden mencionado.

Dichas consideraciones e interpretación de resultados están estandarizados para la técnica empleada, como así mismo lo han reportado en diferentes estudios para la búsqueda de BAL productoras de GABA (Farmer *et al.*, 1985; Cotter *et al.*, 2001; Lacroix N *et al.*, 2010).

La variación en los resultados podría atribuirse al tipo de enzima producida por las diferentes especies, que puede variar en secuencia o estructura. *Enterococcus durans* es un componente minoritario de la microbiota intestinal de humanos y animales domésticos (Devriese *et al.*, 2002). Se encuentra comúnmente en productos alimenticios derivados de origen animal, especialmente leche y queso (Ogier *et al.*, 2008). De igual forma, *Enterococcus faecium* es parte de la microbiota intestinal en humanos y animales, aunque también está distribuida en diversos hábitats como el suelo, agua, verduras y alimentos. Estos enterococos son una fuente importante de biodiversidad en alimentos fermentados tradicionales (Marino *et al.*, 2016; De Reget *et al.*, 2012). Aunque las cepas empleadas son BAL (Campos *et al.*, 2006) que pertenecen al mismo género o incluso a la misma especie, se ha reportado que existen diferentes capacidades dependientes de su propio metabolismo, el cual varía entre subespecies, variedades e incluso a nivel de cepa (Berrocal *et al.*, 2007).

Al momento sólo se ha reportado la presencia de la enzima GAD en una cepa de *E. durans*, cuya secuencia se encuentra depositada en la base de datos de proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con número de acceso EMS75788, la cual está constituida por 610 aminoácidos. Esta enzima se obtuvo de *E. durans* IPLA 655, una cepa aislada de un queso (Fernández *et al.*, 2004).

En cambio la presencia de GAD en *E. faecium*, se muestra en esta base de datos con al menos 77 reportes derivados de diferentes fuentes de aislamiento como son alimentos, embutidos fermentados, sangre de humano, heces fecales de perro. Todas ellas reportan la secuencia de esta enzima constituida por 466 aminoácidos. Esta información demuestra que diferentes especies bacterianas pueden dar lugar a la producción de diferentes secuencias de proteínas, como es el caso de la enzima GAD.

Por otra parte, los resultados que obtuvimos sirven como base para el diseño de futuras investigaciones para buscar el beneficio del empleo de las cepas estudiadas, puesto que se ha reportado que pueden presentar un impacto negativo sobre la salud, especialmente *E. faecium*; sin embargo existe poca información que dirija sus investigaciones hacia un impacto positivo en la salud o por sus aplicaciones tecnológicas en la industria alimentaria. En este estudio se ha demostrado la

capacidad de estas especies de BAL para producir la enzima GAD, la cual a su vez indica la capacidad de producir GABA siempre y cuando esté presente ácido glutámico en el medio, como ocurre en la leche y productos lácteos. Estos resultados vislumbran grandes perspectivas para aportar una mejora a la salud, considerando que este compuesto ha mostrado una variedad de funciones benéficas en el organismo humano. De igual forma, es importante que se identifiquen las cepas faltantes incluidas en este estudio, pues con ello se puede obtener más información sobre el QCC como fuente de cepas de BAL productoras de GABA.

X. CONCLUSIONES

Este trabajo permitió poner en evidencia que las 38 cepas de bacterias ácido lácticas de estudio, aisladas del Queso Crema de Chiapas, fueron productoras de ácido gamma-aminobutírico. Del total de las cepas evaluadas, 18 (47.3 %) presentaron una alta actividad enzimática GAD, por lo cual pueden ser consideradas como cepas con alta capacidad productora de GABA. Es importante mencionar que, de este grupo, 8 cepas pertenecieron a *E. durans*, 2 a *E. faecium* y 8 a cepas no identificadas. El resto de las cepas se caracterizaron por una actividad baja, de las cuales 4 pertenecieron a *E. durans*, 4 a *E. faecium* y 12 a las no identificadas. Estos resultados indican que el QCC es una buena fuente de BAL productoras de GABA.

XI. RECOMENDACIONES

La metodología utilizada en este estudio permite evaluar cualitativamente a estas cepas por su capacidad para producir GABA, sin embargo sería importante utilizar alguna técnica de cuantificación, como las que se mencionaron anteriormente en el apartado de marco teórico, para confirmar su capacidad de producir GABA. Asimismo, la identificación fenotípica y genotípica faltante de las 20 cepas evaluadas permitirá tener un mayor panorama acerca del QCC como fuente de BAL productoras de GABA.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdou A., Higashiguchi S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H. & Yokogoshi, H. (2006). Relaxation and immunity enhancement effects of γ -Aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Department of Research and Development, Pharma Foods International Co. Ltd Review* 26: 201–208.

Baduí, D. S. (1999). *Química de los alimentos*. México: Longam de México. 15- 39: 581- 610.

Bedolla-Bernal. (2004). *Introducción a la tecnología de alimentos*. México Linusa. *Noriega*. 2: 148-158.

Bertrand-Harb, C., Ivanova, I., Dalgalarondo, M. & Haertllé, T. (2003). *Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation*. *International Dairy Journal*. XIII, 39-45.

Bergey., David H., Holt J., Krieg, Noel R.; Sneath. & Peter H. A. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins, novena edición.

Berrocal, D., Arias M. & Henderson. (2007). Evaluación de la actividad de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogur. *ALAN*. [online]. 52 (4): 375-380.

Buddhala, C., Hsu, C.C *et al.* (2009). A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochem Int* 55(1–3): 9–12

Cabeza, E. (2008). Bacterias ácido lácticas (BAL). Aplicaciones como cultivos starter para la industria láctea y cárnica.

Campos, A., Rodríguez, O., Calo-Mata, Pilar., Prado, M & Barros-Velázquez, J. (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). Food Research International, 39 (3): 356–364.

Casado-Rios, M. (2014). Aplicaciones de la electroforesis capilar en el estudio de errores congénitos del metabolismo. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.

Cervantes, E., Villegas de Gante, Caseín V, & Espinoza O. (2008). *Los quesos mexicanos genuinos: patrimonio cultural que debe rescatarse*. México, D.F.: Mundi-prensa, 53- 59.

Corzo-Cobos, E. G. (2014). Identificación y selección de bacterias ácido lácticas aisladas del queso Crema de Chiapas con capacidad biogeneradora de aromas lácticos. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.

Cotter P.D., Gahan C.G., Hill C. (2001). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. Molecular Microbiology, 38:465–475.

De Regt M., Schaik W., Luit-Asbroek M., Dekker h., Duijkeren E., Koning C., Bonten, M & Willems, R. (2012).. Hospital and Community Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium* are Evolutionarily Closely Linked but Have Diversified through Niche Adaptation. PLoS ONE, 7 (2) 30-319.

Diamond. D., Lau K. T., Brady, S., Cleary, J. (2008). "Integration of analytical measurements and wireless communications-Current issues and future strategies Review, 75 (3): 606.

Devriese, L. A., Pot, B. & Collins, M. D. (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol* 75, pp. 399-388.

Devriese, L.A, Vancanneyt, M., Descheemaeker, P., Baele, M., Van, Landuyt, HW, Gordts, B., Butaye, P., Swings J, Haesebrouck F. (2002). Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J. Appl. Microbiol.* 92:: 821– 827.

DeFeudis, B. (1981). Muscimol binding and GABA receptors. *Drug Development Research*, 1, 93–105.

Diana, M., Tres, A., Quilez, j., Llombart, M. y Rafecas, M. (2014). Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with High gamma-aminobutyric acid production. *Journal of food Science and Technology.* 56, 351-355.

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. y Roberfroid, M (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe Consensus document. *Brit. J. Nutr:* 81 51:51-70.

Farmer, J. (1985). New groups of Enterobacteriaceae. *J, Clin Microbiol*, 21: 46-76.

Farsam, H. y M. R. (1984). Nadjari-Moghaddam, "Spectrophotometric determination of meperidine hydrochloride in pharmaceutical preparations by complexation with bromocresol green, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2, no. 3-4: 543-547.

Fernández, M., Linares, DM., Álvarez, M. (2004). Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *J.Food Protect.* 67:2521–2529.

Fischetti, V.A *et al*: The gram-positive cell wall, In Fischetti *et al*, editors: Gram-positive pathogens, Washington DC, ASM Press.

Foulquié, M., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E & Vuyst, L. (2006).The role and application of enterococci in food and Health, International Journal of Food Microbiology Review, 106: 1 – 24.

Franke B. (2005). Developments in the prediction of type 1 diabetes mellitus, with special reference to insulin autoantibodies. Diabetes/ Metabolism Research and Reviews, 21: 395-415.

Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 88: 215-222.

Gutiérrez-Méndez, N., Rodríguez-Figueroa, J. C, González-Córdova. A. F, Nevárez-Moorillón, G. V., Rivera-Chavira, B. & Vallejo-Córdova, B. (2008). Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated From different ecosystems. Canadian Journal of Microbiology, 56: 432–439.

Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., Yamori & (2004). Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar–Kyoto rats. British J Nutr, 92:411–417.

Jin, Z., Kumar, S. & Birnir, B. (2013). GABA is an effective immunomodulatory molecule. Invited Review, 45:87–94.

Kindsdetd, P. (2005) “*American Farmstead Cheese: The Complete Guide to Making and Selling Artisan Cheese*” en *Chelsea Green Publishing*. Vermont, Estados Unidos de América.

Lacroix, N., St-Gelais, D., Champagne, C., Fortín, J., Vuillemand, J. (2010) Characterization of aromatic properties of old-style cheese starters, *J Dairy Sci* 93:3427–3441.

Laws, A. & Marshall V. (2001). *The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with rropy strains of lactic acid bacteria. International Dairy Journal*. XI, 709- 721.

Lyhs, U., Björkroth, J & Korkeala H. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products, *DTU Orbit*: 81.

Liu, R. And Gadzala D. (1997). *Handbook of drug analysis*. Washington: American Chemical Society: 138-221.

Moreno, F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. & Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 1 – 24

Marina, D., Magdalena R., Cristina, A & Joan Q. (2014). Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses. Importance of gamma-aminobutyric acid ornithine content, *Journal of Food Composition and Analysis*, 35: 94-100.

Martino, G., Ingrid, M., Quintana, M., Blancato, V., Galindo, G., Esteban, L & Magni, C. (2016). Draft Genome Sequences of Four *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Argentine Cheese. *Genome Announc*, 4(1): 1576-15.

Marina, M., Maifreni, M., & Rondinini, G. (2003). *Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett.* CCXXIX, 133-138.

Martínez, O., Aguilera A. & Gil A. (2008). Los productos lácteos. En: Alimentos Funcionales: aproximación a una nueva alimentación. J. M. Barberá Mateos y A. Marcos, eds. Dirección General de Salud Pública y Alimentación, Comunidad De Madrid. Madrid Instituto de Nutrición y Trastornos Alimenticios (Inuticam); pp:128-155.

Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of food engineering*. 56(2):181-188.

N. Komatsuzaki, J., Shima, S. Kawamoto., H. Momose & T. Kimura. (2005). Production of γ -Aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods, *Food Microbiol*, 22: 497–504.

NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA10, Productos y servicios, Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Composición y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Ogier, J.C & Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol*. 126:291–301.

Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R. & Takashi, T. (2000). Effect of the defatted Rice germ enriched with GABA for sleeplessness depression, autonomic disorder by oral administration. *Journal of the Japanese society of Food Science and Technology*, 47 8: 596-603.

Park, K., Ji, G., Park M, & Oh, S. (2005) Expression of rice glutamate decarboxylase in *Bifidobacterium longum* enhances γ -aminobutyric acid production. *Biotechnol Lett* 27:1681–1684

Park, K. & Oh, S.H. (2007) Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresource Technol* 98:1675–1679

Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibáñez, E. & Izquierdo-Reyes, F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso fresco tropical. *Universidad y Ciencia* 25(2):159-171.

Rangel-Ortega. (2011). Identificación y caracterización de los consorcios microbianos del queso Fresco Tropical. Tesis de Maestría en Ciencias. Hermosillo, Sonora, México. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. 6-30.

Rodríguez-Figueroa, J. C, Reyes-Díaz R, González-Córdova, A. F., Troncoso-Rojas, R., Vargas-Arispuro, I. & Vallejo-Córdova, B. (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science* 93 5032–5038.

Romero-Castillo, P.A., Leyva-Rúela, G., Cruz-Castillo, J.G. y Santos Moreno, A. (2009). Evaluación de la calidad sanitaria de queso crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas.

Shi, J. & Le Maguer, M. (1998). Functional foods, biochemical & processing aspects 1: 135-167.

Smit, B., Engels, W., Alewijn, M., Lommerse, G., Kippersluisjs, E., Wouters, J. (2005). Chemical conversion of alpha-keto acids in relation to flavour formation in fermented foods, *Agric Food Chem*, 52: 1263-1268.

Steijns, J. (2001). Milk ingredients as nutraceuticals. *International Journal of Dairy Technology*, 54(3): 81-88.

Siragusa, S., Angelis, M., Di, R., Rizzello, C., Coda, R., Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl Environ Microbiol*, 73: 7283–7290

Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I. & Lozo, J. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 112: 230-235.

Torres-Llanez, M., Vallejo-Córdova, B., Díaz-Cinco, M., Mazorra-Manzano, M., y González-Córdova, A. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*, 17: 683-690.

Thomas, C.M., Hong, T., Van, P. J., Hemarajata P., Trinh, D.V *et al.* (2012). Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling. *PLoS ONE* 7(2): e31951. doi: 10.1371/journal.pone.0031951.

Tsoraeva, A. & Muñoz, J. (2005). Aplicación de la prueba rápida de ácido glutámico descarboxilasa para la confirmación de *Escherichia coli* aisladas a partir de muestras clínicas, *Rev. Cubana Med Trop*, 57 (3): 1-8.

Tujioka, K., Ohsumi, M., Horie, K., Kim, M., Hayase, K., Yokogoshi, H. (2009). Dietary gamma-aminobutyric acid affects the brain protein synthesis rate in ovariectomized female rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 55:75–80.

Villegas de Gante, A. (2008). Los quesos mexicanos genuinos (Necesidad de su rescate y valoración). México, D.F.: Carnilac Industrial. III, 1-8.

Villegas, A., Santos, A., & Hernández, A. (2011) a. Caracterización del Queso Fresco de Chiapas (1a ed.) Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. Edo. De México, México.

Villegas, A. (2004). Tecnología Quesera (Primera ed.). Mexico, D.F.: Trillas.

Villegas, A. (1993). Los quesos mexicanos. Ed. CIESTAAM

Veisseyre. (1988). Lactología técnica. Zaragoza, España: Acribia.

Vuyst, L. & VANDAMME, E. (1994). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Department of Biochemical and microbial technology.* 91-142.

Walstra, P. (1999). *Principles of milk properties and processes. Dairy technology.* Ed. CRC Press. 91-109.

Wong, C.G., Bottiglieri, T. & Snead, O.C. (2003). GABA, gamma-hydroxybutyric acid and neurological disease. *Annals of Neurology*, 54, (6): 3-12.

Wu, J. & Ding, X. (2014). Hypotensive and physiological effect of Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agri Food Chem*, 49: 501–6.

Yokoyama, S., Hiramatsu, J. & Hayakawa, K. (2002). Production of g-aminobutyric acid from alcohol distillery less by *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, (1): 95-97.

Zhao, W., Hu, S., Huang, J., Ke, P., Yao, S., Lei, Y., Mei, L. & Wang. J. (2016). Permeabilization of *Escherichia coli* with Ampicillin for a Whole Cell Biocatalyst with Enhanced Glutamate Decarboxylase Activity. *Chinese Journal of CHEMICAL ENGINEERING review*, 22, (7): 1004-9541.

XIII. ANEXOS

Preparación de materiales.



Figura A.



Figura B.



Figura C.



Figura D.



Figura E.



Figura F.



Figura G.



Figura H.



Figura I.



Figura J.



Figura K.



Figura L.



Figura M.



Figura N.

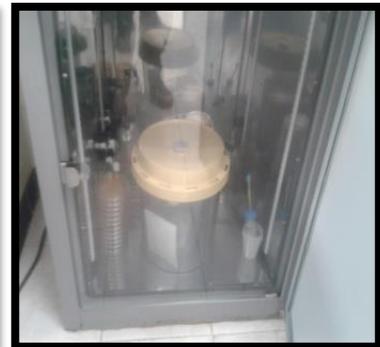


Figura Ñ.



Figura O.



Figura P.

Descripción de figuras.

Figura A. Acomodo de tubos de ensayo; Figura B. Pesado de agar; Figura C. Dilución de agar; Figura D. Llenado de tubos con agar (5 ml); Figura E. Tubos llenos y tapados. Figura F. Esterilización de tubos; Figura G. Tubos esterilizados; Figura H. Rotulación de tubos; Figura I. inoculación; Figura M. cerrado de tubos; Figura N. Muestras en anaerobiosis; Figura Ñ. Incubacion de muestras; Figura O y P. Comprobación visual de Presencia de enzima GAD.

Tabla 2. Cepas aisladas e identificadas de Queso crema de Chiapas. Orozco. (2014)

Código de cepa	Nombre
1	N/I
2	<i>Enterococcus durans</i>
3	<i>Enterococcus faecium</i>
4	<i>Enterococcus durans</i>
5	<i>Enterococcus durans</i>
6	<i>Enterococcus durans</i>
7	<i>Enterococcus durans</i>
8	<i>Enterococcus durans</i>

11	N/I
12	N/I
13	<i>Enterococcus faecium</i>
14	N/I
15	N/I
16	N/I
17	N/I
18	N/I
19	<i>Enterococcus faecium</i>
20	N/I
21	<i>Enterococcus faecium</i>
22	<i>Enterococcus durans</i>
23	<i>Enterococcus faecium</i>
24	<i>Enterococcus durans</i>
25	N/I
26	N/I
27	N/I
28	N/I
29	N/I
30	<i>Enterococcus durans</i>
31	N/I
32	<i>Enterococcus faecium</i>
33	N/I
34	<i>Enterococcus durans</i>
35	<i>Enterococcus durans</i>
36	<i>Enterococcus durans</i>
37	N/I
38	N/I
39	N/I
38	N/I

Tabla 3. Presencia de la enzima GAD en cepas de BAL

Código de cepa	Presencia de enzima GAD	Sin presencia de enzima GABA
1	X	
2	X	
3	X	
5	X	
6	X	
7	X	
8	X	

11	X
12	X
13	X
14	X
15	X
16	X
17	X
18	X
19	X
20	X
21	X
22	X
23	X
24	X
25	X
26	X
27	X
28	X
29	X
30	X
31	X
32	X
33	X
34	X
35	X
36	X
37	X
38	X
39	X
38	X

LICENCIA DE USO DE OBRA

LICENCIA DE USO OTORGADA POR BELTRA CASTRO JOSE ANTONIO, de nacionalidad mexicano mayor de edad, con domicilio ubicado en Cubiri de portelas, Sinaloa, en mi calidad de titular de los derechos patrimoniales y morales y autor de la tesis denominada **"SELECCION DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS PRODUCTORAS DE ACIDO GAMMA-AMINOBUTIRICO AISLADAS DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS"** en adelante **"LA OBRA"** quien para todos los fines del presente documento se denominará **"EL AUTOR Y/O TITULAR"**, a favor del Instituto Tecnológico de Sinaloa de Leyva del Tecnológico Nacional de México, la cual se registrá por las clausulas siguientes:

PRIMERA-OBJETO: **"EL AUTOR Y/O TITULAR"**, mediante el presente documento otorga al Instituto Tecnológico de Sinaloa de Leyva del Tecnológico Nacional de México, licencia de uso gratuito e indefinida respecto de **"LA OBRA"**, para almacenar, preservar, publicar, reproducir y/o divulgar la misma, con fines académicos, por cualquier medio en forma física y a través el repositorio institucional y del repositorio nacional, este último consultable en la página: (<https://www.repositorionacionalcti.mx/>).

SEGUNDA-TERRITORIO: La presente licencia se otorga, de manera no exclusiva, sin limitación geografía o territorial alguna, de manera gratuita e indefinida.

TERCERA-ALCANCE: La presente licencia contempla la autorización para formato uso de **"LA OBRA"** en cualquier formato o soporte material y se extiende a la utilización, de manera enunciativa más no limitativa a los siguiente medios: óptico, magnético, electrónico, virtual (red), mensaje de datos o similar conocido por conocerse.

En medio óptico, magnético, electrónico, en red, mensajes de datos o similar, conocido o por conocerse.

CUARTA-EXCLUSIVIDAD: La presente licencia de so aquí establecida no implica exclusividad en favor del Instituto Tecnológico de Sinaloa de Leyva; por lo tanto, **"EL AUTOR Y/O TITULAR"** conserva los derechos patrimoniales y morales de **"LA OBRA"**, objeto del presente documento.

QUINTA-CREDITOS: El Instituto Tecnológico de Sinaloa de Leyva y/o el Tecnológico Nacional de México reconoce que el **"AUTOR Y/O TITULAR"** es el único, primigenio y perpetuo titular de los derechos morales sobre **"LA OBRA"**; por lo tanto, siempre deberá otorgarle los créditos correspondientes por la autoría de la misma.

SEXTO-AUTORIA: **"EL AUTOR Y/O TITULAR"** manifiesta ser el único titular de los derechos de autor que derivan de **"LA OBRA"** y declara que el material objeto del presente fue realizado por él, sin violentar o usurpar derechos de propiedad intelectual de terceros; por lo tanto, en caso de controversia sobre los mismos, se obliga a ser el único responsable.

Dado en la ciudad de Sinaloa de Leyva, Sin., a los 07 días del mes de Diciembre del 2021.

"EL AUTOR Y/O TITULAR"

Jose A. Beltrán

BELTRAN CASTRO JOSE ANTONIO

"EL INSTITUTO TECNOLOGICO DE SINALOA DE LEYVA"

Camargo Luque

M.A.P. ASUAN CAMARGO LUQUE
DIRECTORA

LICENCIA DE USO DE OBRA

LICENCIA DE USO OTORGADA POR DRA. NORMA ALICIA MACIAS RODRIGUEZ, de nacionalidad mexicana mayor de edad, con domicilio ubicado en callejo Moctezuma No. 22, col. Centro, Guasave Sinaloa, en mi calidad de titular de los derechos patrimoniales y morales y autor de la tesis denominada **"SELECCION DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS PRODUCTORAS DE ACIDO GAMMA-AMINOBUTIRICO AISLADAS DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS"** en adelante **"LA OBRA"** quien para todos los fines del presente documento se denominará **"EL AUTOR Y/O TITULAR"**, a favor del Instituto Tecnológico de Sinaloa de Leyva del Tecnológico Nacional de México, la cual se registrá por las clausulas siguientes:

PRIMERA-OBJETO: "EL AUTOR Y/O TITULAR", mediante el presente documento otorga al Instituto Tecnológico de Sinaloa de Leyva del Tecnológico Nacional de México, licencia de uso gratuito e indefinida respecto de **"LA OBRA"**, para almacenar, preservar, publicar, reproducir y/o divulgar la misma, con fines académicos, por cualquier medio en forma física y a través el repositorio institucional y del repositorio nacional, este último consultable en la página: (<https://www.repositorionacionalcti.mx/>).

SEGUNDA-TERRITORIO: La presente licencia se otorga, de manera no exclusiva, sin limitación geografía o territorial alguna, de manera gratuita e indefinida.

TERCERA-ALCANCE: La presente licencia contempla la autorización para formato uso de **"LA OBRA"** en cualquier formato o soporte material y se extiende a la utilización, de manera enunciativa más no limitativa a los siguiente medios: óptico, magnético, electrónico, virtual (red), mensaje de datos o similar conocido por conocerse.

En medio óptico, magnético, electrónico, en red, mensajes de datos o similar, conocido o por conocerse.

CUARTA-EXCLUSIVIDAD: La presente licencia de so aquí establecida no implica exclusividad en favor del Instituto Tecnológico de Sinaloa de Leyva; por lo tanto, **"EL AUTOR Y/O TITULAR"** conserva los derechos patrimoniales y morales de **"LA OBRA"**, objeto del presente documento.

QUINTA-CREDITOS: El Instituto Tecnológico de Sinaloa de Leyva y/o el Tecnológico Nacional de México reconoce que el **"AUTOR Y/O TITULAR"** es el único, primigenio y perpetuo titular de los derechos morales sobre **"LA OBRA"**; por lo tanto, siempre deberá otorgarle los créditos correspondientes por la autoría de la misma.

SEXTO-AUTORIA: "EL AUTOR Y/O TITULAR" manifiesta ser el único titular de los derechos de autor que derivan de **"LA OBRA"** y declara que el material objeto del presente fue realizado por él, sin violentar o usurpar derechos de propiedad intelectual de terceros; por lo tanto, en caso de controversia sobre los mismos, se obliga a ser el único responsable.

Dado en la ciudad de Sinaloa de Leyva, Sin., a los 07 días del mes de Diciembre del 2021.

"EL AUTOR Y/O TITULAR"

DR. NORMA ALICIA MACIAS RODRIGUEZ

"EL INSTITUTO TECNOLOGICO DE SINALOA DE LEYVA"

M.A.P. ASUAN CAMARGO LUQUE
DIRECTORA