



Desarrollo de un pan de masa madre rico en GABA y péptidos IECA

Marina Diana Pérez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



DESARROLLO DE UN PAN DE MASA MADRE RICO EN GABA Y PÉPTIDOS IECA

Marina Diana Pérez





Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Departament de Nutrició i Bromatologia

DESARROLLO DE UN PAN DE MASA MADRE RICO EN GABA Y PÉPTIDOS IECA

Marina Diana Pérez

Tesis Doctoral
Universidad de Barcelona
Barcelona 2014



Universitat
de Barcelona

Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Departament de Nutrició i Bromtaologia
Programa de Doctorado de Alimentación y Nutrición
2011-2014

Título: **Desarrollo de un pan de masa madre rico
en GABA y péptidos IECA**

Memoria presentada por
Marina Diana Pérez
para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Los directores,

Dr. Joan Quílez i Grau

Dra. Magdalena Rafecas Martínez

La doctoranda,

Marina Diana Pérez

Barcelona, Octubre 2014

Este proyecto ha contado con la financiación de:

Europastry, S.A, mediante la concesión del programa Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial IDI-20110755 bajo el título “Pan con propiedades saludables”.



Agradecimientos

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la financiación e iniciativa de Europastry, S.A junto con el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Barcelona. Además, han colaborado gratamente el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición del Centro Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC, Madrid, España) y el grupo Puratos (Andenne, Belgium) a los que agradezco mucho su refuerzo. Me gustaría dar las gracias al Laboratorio de Microbiología y al Departamento Técnico de Panificación de la empresa Europastry así como la Unidad de Técnicas Separativas y Síntesis de Péptidos de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona los cuales han formado un pilar muy importante en el desarrollo de este proyecto.

Me gustaría expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a aquellas personas que de una forma directa o indirecta me han ayudado a realizar esta tesis doctoral. Con especial cariño:

A Joan Quílez por incentivar y alentar este trabajo ofreciéndome generosamente la oportunidad de llevarlo a cabo siempre gracias a su dedicado seguimiento y positividad durante estos años. Ha sido muy inspirador y emocionante trabajar bajo su liderazgo.

A Magda Rafecas por abrirme amablemente paso a formar parte de su grupo investigador y por su disposición a ayudarme siempre que ha sido necesario. Asimismo agradecer al resto de profesores, compañeros y personal del Departamento de Nutrición la ayuda y comprensión continuamente brindada.

A las estudiantes, Cristina Arco y Chiara Giannola, que eficaz y desinteresadamente han colaborado conmigo; en especial a Cristina que ha sido mi mano derecha durante mucho tiempo y con la que comparto una verdadera amistad.

A las chicas del Laboratorio de Microbiología de Europastry, Marta Llombart, Mari Carmen Núñez, Anna Penadès y Carolina Aguilera por vuestra bondad y modo humano de ampararme y apoyarme desde el primer día.

Al resto de compañeros y compañeras de Europastry por estar a mi lado y obsequiarme siempre su amistad y ayuda dentro y también fuera del trabajo. En especial a Ainhoa de la Torre, por su eterna sonrisa, a Victòria Sellès por la ayuda estadística, a Alexandra Atochero, la 'marinada' (Marina Muñoz y Marina Román), Eulàlia Gallès y Eva Sanz por hacer de las jornadas laborales las batallas más divertidas y alocadas nunca vividas. Porque cuando todo está negro y deprimente, con vosotras se vuelve luminoso y ocurrente. Gracias por las risas infinitas!

A mi círculo de amistades más íntimo, Claire Niemtschik, Natalia Toro, Eva Llosa, Gemma Fernández, Carla Jové, David Miñarro...por guiarme y asesorarme siempre hacia el mejor camino.

A mi padre, Antonio Diana, por enseñarme a ser racional y sensata. Por demostrarme cada día que la vida merece la pena.

A Emilio, por emprender la aventura de la vida incondicionalmente a mi lado.

Moltes gràcies a tothom!!!

Marina Diana

Investigación es lo que hago cuando no sé lo que estoy haciendo.

Wernher Von Braun

Desarrollo de un pan de masa madre rico en GABA y péptidos IECA

Resumen

Existe una relación evidente entre el consumo de sal y el mayor riesgo de padecer hipertensión. La hipertensión es una enfermedad crónica que afecta a algo más del 40% de la población general adulta en España. El pan es uno de los alimentos básicos de la dieta humana siendo en España la principal fuente dietética de sodio en la población adulta. El uso de masa madre produce un pan con una notable mejora de las características nutricionales y sensoriales, incluyendo aroma, sabor, textura de la corteza y miga, así como un alargamiento de la vida útil del pan. En este contexto nace el proyecto de obtener una nueva formulación de pan de masa madre funcionalmente activo, contribuyendo a disponer de un alimento saludable con propiedades beneficiosas para la salud. Para ello, se ha estudiado la posibilidad de sustituir el sodio (Na) por potasio (K) en las formulaciones de pan y la inclusión de moléculas biológicamente activas con un efecto hipotensor científicamente demostrado. El Ácido γ -Amino Butírico (GABA), un amino ácido no proteico, con numerosas funciones fisiológicas entre los que se encuentra el sistema de regulación de la presión arterial. La ingesta de un alimento rico en GABA y una reducción de su contenido en sal pueden ayudar a reducir la tensión arterial. En el proyecto se reúnen por tanto, las dos condiciones básicas para la obtención de un pan, elaborado con una masa madre que realza el sabor del pan, enmascarando posibles defectos asociados a la inclusión de sal potásica y por otra parte, la posibilidad de que esta masa madre contenga además sustancias bioactivas como el GABA y los Inhibidores del Enzima Convertidor de la Angiotensina (IECA).

En el primer estudio se aislaron bacterias ácido lácticas de quesos artesanales españoles con el fin de obtener cepas altamente productoras de GABA. Las cepas fueron sometidas a ensayos cualitativos y ensayos cuantitativos para evaluar la habilidad de sintetizar GABA. Tras la selección de la mejor cepa, *Lactobacillus brevis* CECT 8183, ésta se usó para la producción de una masa madre optimizada para la producción de GABA. Los ensayos se llevaron a cabo a escala laboratorio y a escala piloto. En el estudio II se analizó el contenido de aminoácidos libres de los quesos artesanales con especial interés en conocer el perfil de GABA y ornitina como posibles compuestos bioactivos en los quesos y encontrar relación entre la capacidad de producción de la cepa aislada y el contenido de GABA presente en el queso. En el tercer estudio se obtuvo un pan elaborado con la masa madre rica en GABA que fue comparado con otros panes del mercado en cuanto contenido de aminoácidos, aminos biógenos y acrilamida como principales compuestos derivados del nitrógeno. Finalmente, se hizo una revisión del GABA como molécula bioactiva con gran interés aplicativo en la industria alimentaria. Estos resultados pueden contribuir a mejorar los beneficios para la salud de los panes enriquecidos en GABA y a tener en cuenta la cepa *Lactobacillus brevis* CECT 8183 como estándar para la producción de alimentos ricos en GABA.

Palabras clave: GABA, bacterias ácido lácticas, hipertensión, masa madre, pan

Dirección del autor: Marina Diana, Departamento de Biotecnología, Europastry, S.A.

08210, Barberà del Vallès, Spain

E-mail: mdiana@europastry.com

Production of a sourdough bread rich in GABA and ACE-inhibitor peptides

Abstract

There is a clear relation between the consumption of salt and increased risk of hypertension. Hypertension is a chronic condition that affects just over 40% of the general adult population in Spain. Bread is one of the basic foodstuffs of the human diet and in Spain it is the main dietary source of sodium for the adult population. The use of dough containing naturally occurring lactobacilli and yeasts produces bread with a notable improvement in nutritional and sensorial characteristics, including the aroma, taste and texture of both the crust and the crumb, and also increases the useful life of the bread. From this stems the project to obtain a new bread formulation using such a dough that is functionally active and contributes to providing a healthy foodstuff with beneficial properties. To this end we studied the possibility of substituting the sodium (Na) by potassium (K) in bread formulations and the inclusion of biologically active molecules with a scientifically demonstrated hypotensive effect. γ -Aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid with numerous physiological functions including playing a role in the regulation of blood pressure. Intake of food rich in GABA and a reduction in its salt content may help reduce blood pressure. Therefore, this project brings together two basic conditions for the production of a bread made using dough containing naturally occurring lactobacilli and yeasts which heightens the taste of the bread, that masks possible defects associated with the inclusion of potassium salt and furthermore offers the possibility that this dough also contains bioactive substances such as GABA and angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitors.

In the first study lactic acid bacteria were isolated from Spanish artisanal cheeses in order to obtain strains that produce large amounts of GABA. The strains were subjected to qualitative and quantitative tests to evaluate their capacity to synthesise GABA. After selection of the best strain, *Lactobacillus brevis* CECT 8183, it was used to produce a dough optimised for the production of GABA. The tests were carried out at the laboratory scale and at pilot scale. In study II, the free amino acid content of the artisanal cheeses was analysed paying special attention to the GABA and ornithine profiles as possible bioactive substances in the cheeses and to find the relation between the production capacity of the strain isolated and the GABA contents of the cheese. In the third study a bread was produced with the dough described above, rich in GABA, and it was compared with other commercially available breads in terms of amino acid, biogenic amine and acrylamide contents as the main nitrogen-derived compounds. Finally, we reviewed GABA as a bioactive molecule with a great practical potential in the food industry. These results could contribute to improving the health benefits of breads enriched in GABA and to raising awareness of the strain *Lactobacillus brevis* CECT 8183 as a starter ingredient for the production of foodstuffs rich in GABA.

Keywords: GABA, lactic acid bacteria, hypertension, sourdough, bread

Author's address: Marina Diana, Biotechnology Department, Europastry, S.A.
08210, Barberà del Vallès, Spain

E-mail: mdiana@europastry.com

CONTENIDO

Publicaciones y comunicaciones científicas	I
Índice de tablas	III
Índice de figuras	IV
Abreviaciones	V
1. Introducción	1
1.1 Hipertensión arterial y salud humana	1
1.1.1 Causas de la hipertension arterial y prevalencia	2
1.1.2 Evidencia epidemiológica del consumo de sal y el riesgo de padecer hipertensión	3
1.1.3 Tratamiento farmacológico e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	6
1.2 Ácido Gamma-Aminobutírico como compuesto bioactivo	7
1.2.1 Función del ácido gamma-aminobutírico para el tratamiento de la hipertensión arterial	9
1.2.2 Otras funciones fisiológicas del ácido gamma-aminobutírico	12
1.2.3 Síntesis de ácido gamma-aminobutírico por bacterias ácido lácticas	13
1.2.4 Síntesis de ácido gamma-aminobutírico por otros microorganismos y plantas	14
1.2.5 Mecanismos y técnicas para aumentar la síntesis de ácido gamma-aminobutírico	16
1.3 Alimentos enriquecidos en ácido gamma-aminobutírico	17
1.3.1 Masas madre de pan y otros alimentos basados en el cereal	18
1.3.2 Productos lácteos	19
1.3.3 Verduras y legumbres	19
1.3.4 Otros alimentos	20
1.3.5 Bebidas	20
1.4 El uso de masa madre para la elaboración del pan	21
1.4.1 Historia	22
1.4.2 Tipos de masa madre y prefermentos	23
1.4.3 Microbiología de las masas madre	24
1.4.4 Fenómenos bioquímicos	27
2. Hipótesis y objetivos de la tesis	30

3. Diseño experimental y metodología	31
3.1 Diseño experimental	31
3.2 Microorganismos y análisis microbiológicos	32
3.2.1 Screening de bacterias ácido lácticas y análisis cualitativo de GABA	32
3.2.2 Caracterització fenotípica	33
3.2.3 Caracterització genotípica	33
3.3 Análisis cuantitativo de GABA y otros aminoácidos	33
3.4 Análisis de aminas biógenas	34
3.5 Análisis de acrilamida	35
3.6 Análisis de la actividad IECA	35
3.7 Estudio comparativo de cepas <i>Lactobacillus</i>	36
3.8 Análisis estadístico	38
4. Artículos publicados	39
4.1 <i>Spanish Cheese Screening and Selection of Lactic Acid Bacteria with High Gamma Aminobutyric Acid Production</i>	39
4.2 <i>Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content</i>	46
4.3 <i>Free amino acids, acrylamide and biogenic amines in gamma-aminobutyric acid enriched sourdough and commercial breads</i>	54
4.4 <i>Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review</i>	61
4.5 Patente PCT/ES2013/070652: Nuevas cepas de las especie <i>Lactobacillus brevis</i> para la elaboración de masas madre panarias	76
4.6 <i>A Multistrategic Approach in the Development of Sourdough Bread Targeted Towards Blood Pressure Reduction</i>	107
5. Discusión general	124
6. Conclusiones	132
Referencias	133

Publicaciones y comunicaciones científicas relativas a la tesis doctoral

La presente tesis está basada en las siguientes publicaciones, las cuales están referidas a lo largo del manuscrito mediante números Romanos (I-V).

Publicaciones

I

Título: Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production.

Autores: Marina Diana, Alba Tres, Joan Quílez, Marta Llombart & Magdalena Rafecas

Referencia: LWT, Food Science and Technology, 2014, 56, 351-355

II

Título: Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content.

Autores: Marina Diana, Magdalena Rafecas, Cristina Arco & Joan Quílez

Referencia: Food Composition and Analysis, 2014, 35 (2), 94-100

III

Título: Free amino acids, acrylamide and biogenic amines in gamma aminobutyric acid enriched sourdough and commercial breads.

Autores: Marina Diana, Magdalena Rafecas & Joan Quílez

Referencia: Journal of Cereal Sciences, 2014, *in press*

IV

Título: Gamma aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review.

Autores: Marina Diana, Joan Quílez & Magdalena Rafecas

Referencia: Journal of Functional Food, 2014, 10, 407-420

Patentes

V

Título: Nuevas cepas de la especie *Lactobacillus brevis* para la elaboración de masas madres panarias.

Autores: Marina Diana, Marta Llombart, Magdalena Rafecas y Joan Quílez

Referencia: PCT/ES2013/070652, Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid

Comunicaciones científicas

Título: Estudio de bacterias productoras de Ácido γ -Amino Butírico y su futura aplicación en productos alimenticios.

Autores: Marina Diana, Joan Quílez & Magdalena Rafecas

Evento: XVI Jornadas Nacionales de Nutrición Práctica

Fecha y lugar: 14 y 15 de Marzo 2012, Madrid

Tipo de comunicación: Póster

Título: Highly gamma-aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacteria isolated from artisanal spanish cheeses.

Autores: Marina Diana, Joan Quílez & Magdalena Rafecas

Evento: World Forum for Nutrition Research Conference

Fecha y lugar: 20 de Mayo 2013, Reus (Tarragona)

Tipo de comunicación: Póster

Título: Gamma-aminobutyric acid (GABA) as bioactive compound in food.

Autores: Marina Diana, Magdalena Rafecas & Joan Quílez

Evento: 5th World Congress of Biotechnology

Fecha y lugar: 25 a 27 de Junio 2014, Valencia

Tipo de comunicación: Oral

Otras publicaciones

VI

Título: A Multistrategic Approach in the Development of Sourdough Bread Targeted Towards Blood Pressure Reduction.

Autores: Elena Peñas, Marina Diana, Juana Frías, Joan Quílez & Cristina Martínez-Villaluenga

Referencia: Journal of Plant Food for Human Nutrition, 2014, *enviado*.

VII

Título: Plasma Alkylresorcinol Concentrations Correlate with Whole Grain Wheat and Rye Intake and Show Moderate Reproducibility over a 2- to 3- Month Period in Free-Living Swedish Adults.

Autores: Agneta Andersson, Matti Marklund, Marina Diana & Rikard Landberg

Referencia: Journal of Nutrition, 2011, 141 (9), 1712-8

Índice de tablas

Tabla 1. Cifras de la presión arterial según el Consenso Europeo de Hipertensión Arterial, 2013.	2
Tabla 2. Prevalencia de la HTA en la población adulta de Europa y Norteamérica.	3
Tabla 3. Posibles beneficios para la presión arterial sistólica de distintas modificaciones del estilo de vida.	5
Tabla 4. Algunos ensayos del uso de GABA como agente hipotensor.	11-12
Tabla 5. Funciones fisiológicas del GABA.	15
Tabla 6. Ventajas del uso de la masa madre en la elaboración del pan.	22
Tabla 7. BAL homo- y heterofermentativas encontradas en masas madre espontáneamente fermentadas.	26
Tabla 8. Levaduras aisladas de masas madre y sus sinónimos.	27
Tabla 9. Compuestos aromáticos volátiles y no volátiles presentes en masa madre de harina de trigo.	28
Tabla 10. Funciones generales de la masa madre para panes de trigo y centeno.	29
Tabla 11. Receta de ingredientes en la elaboración del pan experimental con masa madre rica en GABA.	31
Tabla 12. Cepas microbianas usadas en los estudios.	32
Tabla 13. Diseño experimental.	128
Tabla 14. Diseño de optimización de la producción de GABA en masa madre.	129
Tabla 15. Concentraciones de GABA obtenidas en la optimización del proceso.	129
Tabla 16. Valores IC ₅₀ de las muestras analizadas	131

Índice de figuras

Figura 1. Ingesta de Sodio y Potasio (mmol/día) estimada en el Paleolítico y actualmente en España	5
Figura 2. Estructura química del IECA Captopril	7
Figura 3. Fórmula estructural del ácido γ -Aminobutírico (GABA)	7
Figura 4. Reacción de descarboxilación del L-glutamato a GABA catalizado por la enzima Glutamato Descarboxilasa (GAD) que es dependiente del cofactor piridoxal 5-fosfato o Vitamina B6	8
Figura 5. Metabolización del GABA en mitocondrias y citoplasma	8
Figura 6. Sistema renina-angiotensina-aldosterona	10
Figura 7. Esquema de la producción de masa madre	24
Figura 8. Bioreactor (Biostat C-DCU, Sartorius, Germany) usado para la fermentación optimizada de GABA.	37
Figura 9. Resultados del <i>screening</i> .	125

Abreviaciones

AB	Aminas Biógenas
AC	Antagonistas de los Canales de calcio
AccQTag	6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinil carbamato
ADN	Ácido Desoxirribonucleótido
ANOVA	Análisis de Variancia
API	Índice de Perfil Analítico
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BB	Beta Bloqueantes
BBC	Canales Beta Bloqueantes
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
CLAE-FR	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia-Fase Reversa
CL-EMT	Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas en Tándem
DASH	Enfoques Dietéticos para Detener la Hipertensión
DM	Diabetes Mellitus
EBMPA	Método Basado en la Enzima por Placa de Microtitulación
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas
ERC	Enfermedad Renal Crónica
FIA	Análisis por Inyección en Flujo
GABA	Ácido Gamma-Aminobutírico
GAD	Ácido Glutámico Descarboxilasa
GRAS	Generalmente Reconocidos como Seguros
HTA	Hipertensión Arterial
IECA	Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IG	Índice Glucémico
NAOS	Nutrición, Actividad física y prevención de la Obesidad
NBRC	Nite Biological Resource Center
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA	Orto-ftaldehído
PA	Presión Arterial
PAS	Presión Arterial Sistólica
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Reacción de la Cadena Polimerasa
PIM	Método del indicador de pH
5'PLP	Piridoxal 5' fosfato
RAS	Sistema Renina Angiotensina
SHR	Ratas Espontáneamente Hipertensas
TAD	Tensión Arterial Diastólica
TAS	Tensión Arterial Sistólica
TTA	Acidez Total Titulable

1. Introducción

1.1 Hipertensión arterial y salud humana

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica caracterizada por un incremento de la presión sanguínea en las arterias por encima de los valores establecidos como normales. La tensión arterial sistólica (PAS) es la ejercida por la sangre al ser expulsada por el ventrículo hacia la aorta, la presión máxima. La tensión arterial diastólica (TAD) es cuando el corazón se relaja, en esta ocasión es la mínima presión ejercida por la sangre. El Consenso Europeo de Hipertensión Arterial (2009) fijó en 140 milímetros de mercurio (mm Hg) para la sistólica o máxima y 90 mm Hg para la diastólica o mínima en adultos (Tabla 1). Se trata de una enfermedad muy común en todo el mundo que afecta a más del 20 por ciento de los adultos entre 40 y 65 años y casi al 50 por ciento en las personas de más de 65 años. Junto con la hipercolesterolemia y la obesidad constituye una de las principales causas de las enfermedades cardiovasculares (ECV). La hipertensión arterial se considera uno de los factores de riesgo cardiovascular más importantes, existiendo una relación directa e independiente entre las cifras elevadas de presión arterial y el desarrollo de ECV.

El conocimiento de las causas de las ECV ha avanzado sustancialmente en las últimas décadas, sin embargo, su prevalencia en el mundo aumenta y éstas constituyen la primera causa de muerte incluso en países en desarrollo. Este tipo de enfermedades son la principal causa de ingreso hospitalario y muerte en España y es el tercer factor de riesgo más importante como contribuyente a la discapacidad en todo el mundo. Suponen un alto coste socioeconómico de más de 9.000 millones de euros al año, una cantidad que se eleva hasta 192.000 millones en el conjunto de la Unión Europea, cifras que ponen de relieve que estas enfermedades representan la mayor carga económica sanitaria en España y en la mayoría de países de la Unión Europea.

La hipertensión arterial supone un importante problema de salud pública por la repercusión que puede tener en los distintos órganos diana como el riñón (insuficiencia renal), el ojo (pérdida de agudeza visual), el sistema nervioso (hemorragia cerebral, trombosis) y también el corazón (insuficiencia cardíaca, angina de pecho e infarto de miocardio), con la consiguiente morbimortalidad y costes para el sistema sanitario, que se estiman entre unos 960 y 1.200 millones de Euros. Estos costes atribuibles a la HTA se dividen en costes directos (43,93%) y costes indirectos (56,07%). Entre los costes directos se encuentran los asistenciales (asistencia primaria y asistencia hospitalaria) y los de farmacia.

Entre los costes indirectos el más importante en términos relativos es el asociado a la mortalidad, seguido por los costes asociados a la incapacidad y, finalmente, el coste asociado a la incapacidad laboral transitoria (Saez & Barceló, 2012).

Tabla 1. Cifras de la presión arterial en adultos según el Consenso Europeo de Hipertensión Arterial, 2013.

Categoría	TAS (mmHg)		TAD (mmHg)
Óptima	<120	y	<80
Normal	<130	y/o	<85
Alta	130-140	y/o	85-90
HTA grado 1	140-159	y/o	90-99
HTA grado 2	160-179	y/o	100-109
HTA grado 3	≥180	y/o	≥110
HTA aislada	≥140	y	<90

TAS: Tensión Arterial Sistólica; TAD: Tensión Arterial Diastólica. La categoría se define por el valor más alto de presión arterial, ya sea sistólica o diastólica. La HTA sistólica aislada debe clasificarse en grados 1, 2 o 3 según los valores de presión arterial sistólica en los intervalos indicados. *Fuente: Mancía, G., Revista Española de Cardiología, 2013.*

1.1.1 Causas de la hipertensión arterial y prevalencia

Las principales causas que aumentan el riesgo de padecer HTA se clasifican en dos grupos: las no modificables como los antecedentes familiares, la raza, la edad, la sensibilidad al sodio y la diabetes; y en causas modificables como los hábitos alimentarios, el sedentarismo, la falta de ejercicio, la mala calidad del sueño, el estrés, fumar, el alcohol y el uso de anticonceptivos orales. No obstante, en muchos casos no se encuentra la causa específica. Alrededor del 90% al 95% de todos los casos de presión arterial alta constituyen lo que se denomina hipertensión primaria, idiopática o esencial. Esto significa que se desconoce la verdadera causa de la presión arterial (PA) alta. Se han propuesto factores psicológicos en el origen de la HTA esencial con respecto a individuos normotensos. Las causas del incremento del tono simpático no son bien conocidas, pudiendo estar involucrados factores de personalidad y estilo de vida. El incremento del tono simpático es un mecanismo que interviene tanto en el inicio como en el mantenimiento de la elevación de la presión arterial. El 5 a 10 por ciento restante de los pacientes con presión arterial alta sufren hipertensión secundaria. Esto significa que la PA alta es causada por otros motivos o enfermedades como son trastornos renales, glándulas suprarrenales o ingesta de medicamentos. Las personas con hipertensión generalmente no tienen ningún síntoma. En algunos casos los pacientes refieren cefalea, mareo y/o decaimiento. Las personas afectadas por esta enfermedad suponen el 30-45% de la población general con un marcado aumento a edades más avanzadas (en mayores de 65 años la prevalencia de HTA es superior al 50%).

La prevalencia de la hipertensión en España se sitúa en torno al 15-20% en población de 15 o más años, del 30 al 36%, en población de 45 años o más, y el 45-48% en población de 65 o más años. El porcentaje de pacientes que conocen su HTA ha ido aumentando progresivamente desde un 50% hace unos quince años hasta más de 75% en la actualidad. Los hombres jóvenes y adultos son más propensos a la hipertensión que las mujeres, pero éstas, después de la menopausia, comienzan a tener la presión elevada y superan a los hombres en número, según el Ministerio de Sanidad y Consumo. La prevalencia de la HTA en la población adulta occidental de Europa y Norteamérica se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Prevalencia de la HTA en la población adulta de Europa y Norteamérica.

Continente/País	Adultos hipertensos entre 35 y 75 años
Europa	44,2%
Alemania	55,3%
Finlandia	48,7%
España	46,8%
Reino Unido	41,7%
Suecia	38,4%
Italia	37,7%
Norte América	27,6%
Estados Unidos	27,8%
Canadá	27,4%

TAS>140; TAD>90

Pese que los avances en el conocimiento, tratamiento y control de la HTA en España han sido notables, la realidad es que el nivel de control y tratamiento podría ser mejorable.

Esta situación está determinada por la falta de detección de la enfermedad, fallos en la adecuación del tratamiento establecido y la baja adherencia al tratamiento.

1.1.2 Evidencia epidemiológica del consumo de sal y el riesgo de padecer hipertensión

La relación entre un consumo elevado de sal y el mayor riesgo de padecer hipertensión arterial, observada no sólo en individuos hipertensos sino también en personas normotensas, es muy sólida y se ha comprobado tanto en estudios en animales y ensayos clínicos, como en estudios epidemiológicos (Mohan & Campbell, 2009). La participación del sodio (sal de los alimentos) en la hipertensión arterial

incluye dos aspectos esenciales: como elemento preventivo de la enfermedad o como factor de importancia en el tratamiento de la afección ya establecida. Además, el consumo excesivo de sal puede contribuir al desarrollo de HTA resistente. El efecto positivo del menor consumo de sal se ha observado incluso a niveles de reducción modestos (Hu & McGregor, 2002).

Actualmente en España se consume una media de 9,7 g diarios de sal, el doble de lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se considera que el 87,5% de la población consume más sal de la recomendada y que ésta se ingiere de forma mayoritaria a través de la alimentación. Es por ello que la OMS recomienda reducir la ingesta de sal por debajo de 5 g al día lo que representa limitar la ingesta diaria de sodio por debajo de 2 g al día. Por todo ello, muchos países han establecido políticas activas para reducir la ingesta de sal en la dieta. En este contexto, se encuadra la Estrategia NAOS (Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad) que el Ministerio de Sanidad y Consumo puso en marcha en 2005 para promover una alimentación saludable y prevenir el sedentarismo. El efecto de la restricción de sodio es mayor en personas de raza negra, personas mayores y en individuos con *Diabetes Mellitus* (DM), síndrome metabólico o enfermedad renal crónica (ERC), y la reducción de sal puede reducir número y dosis de fármacos antihipertensivos. Si bien existe una gran variabilidad individual en la respuesta tensional a la restricción de sal en la dieta, de modo que un 60% de hipertensos son sensibles a la dieta hiposódica, mientras el 40% restante no muestran ninguna reducción en las cifras tensionales con la dieta hiposódica. Desde un punto de vista clínico, es también interesante tanto la reducción de sodio como el incremento de potasio en la dieta. De hecho se ha evidenciado en diferentes estudios, que el incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular se produce cuando los ratios de la ingesta Na/K son elevados (Umesawa et al., 2008; Cook et al., 2009).

Actualmente, suscitan un gran interés los beneficios de la dieta DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension* o Enfoques Dietéticos para Detener la Hipertensión), rica en frutas, verduras y cereales (para incrementar la cantidad de potasio y fibra) y que incluye productos lácteos desnatados, pescado, legumbres, pollo y carne magra. Si se mantiene constante el consumo de sal, se aprecia un descenso significativo de la presión arterial (Tabla 3). Desde una perspectiva evolutiva, el elevado consumo de sal es un fenómeno muy reciente si bien la selección natural no ha producido variaciones significativas desde la agricultura del Neolítico. No obstante, los enormes cambios en la alimentación habidos en el siglo XX son discordantes con nuestro sistema metabólico y con tendencia a desarrollar patologías derivadas de este hecho. Una de las principales diferencias que se han observado se encuentra en el consumo de sodio (Na) y potasio (K). La ingesta actual de K es aproximadamente de un 25% respecto a la calculada para el paleolítico, mientras que la de sodio es 5 veces superior (Figura 1).

Tabla 3. Posibles beneficios para la presión arterial sistólica de distintas modificaciones del estilo de vida.

Modificación	Recomendación	Intervalo de reducción
Reducir el peso	Mantener un peso corporal normal (índice de masa corporal: 18,5 – 24,9 kg/m ²)	5 -20 mmHg/10 kg pérdida de peso
Adoptar el plan de alimentación DASH	Consumir una dieta rica en frutas, verduras y productos lácteos desnatados con menos contenido de grasas saturadas y de grasa en general	8 – 14 mmHg
Reducir la cantidad de sodio de la dieta	Reducir el consumo de sodio a un máximo de 2,4 g de sodio o 6 g de sal al día	2 – 8 mmHg
Actividad física	Realizar ejercicio aeróbico de forma regular (caminar al menos 30 minutos al día, casi todos los días de la semana)	4 – 9 mmHg
Moderar el consumo de alcohol	Limitar el consumo a un máximo de 3 unidades de alcohol* al día para hombres y 2 para mujeres y hombres de constitución ligera	2 – 4 mmHg

*1 unidad de alcohol = 10 g de alcohol puro = 1 vaso de cerveza (25 cl) o vino (10 cl) o whisky (3 cl)

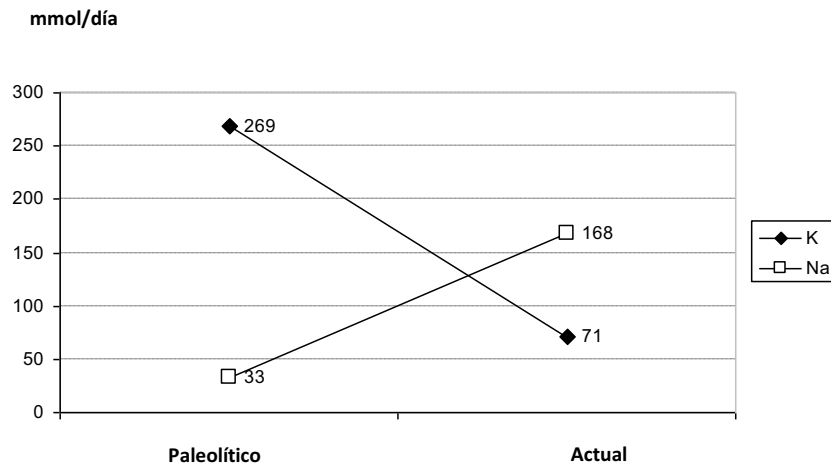


Figura 1. Ingesta de Sodio y Potasio (mmol/día) estimada en el Paleolítico y actualmente en España.

Esta relación Na/K tan dispar, de 0,13 a 2,51 (mmol) en la actualidad implica una constante labor metabólica para eliminar el exceso de Na que puede conllevar a la HTA.

1.1.3 Tratamiento farmacológico e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

El mayor beneficio del tratamiento farmacológico en la HTA es la reducción de la PA *per se* y éste es independiente del fármaco que se utilice. Los fármacos más adecuados para instaurar y mantener el tratamiento antihipertensivo en monoterapia o combinados son: los diuréticos (incluidas tiacidas, clortalidona e indapamida), los bloqueadores beta (BB), los antagonistas de los canales de calcio (AC) y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). Los fármacos diuréticos son sustancias de gran efectividad y bajo coste. Se ha comprobado que los diuréticos consiguen controlar los valores de presión arterial en la mayoría de pacientes, reduciendo incluso la morbi-mortalidad cardiovascular. No obstante, existen efectos adversos en la administración de dosis altas, ya que producen cambios en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono y la disminución de magnesio y potasio en sangre. Los beta bloqueadores o agentes bloqueadores beta-adrenérgicos son antagonistas de las acciones endógenas de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y actúan disminuyendo el gasto cardíaco y la secreción de renina. Algunos ejemplos de beta bloqueantes incluyen el metoprolol acebutolol, el bisoprolol, el esmolol, el propranolol, el atenolol entre otros. Los antagonistas del calcio o bloqueadores de los canales de calcio (BBC) actúan mediante el bloqueo de la corriente de calcio en las células produciendo una vasodilatación arteriolar y una reducción en la resistencia vascular periférica. Existen 4 grupos de BBC: las dihidropiridinas, las fenilalquilaminas, las benzotiazepinas y las bencimilimidazoliltetralina.

Por último, los inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina y antagonistas del receptor de la angiotensina II son las dos clases de fármacos más utilizadas en el tratamiento antihipertensivo. Los inhibidores ECA más importantes son el captopril (Figura 2), el enalapril, el lisinopril y el ramipril. La angiotensina I es un decapeptido que carece prácticamente de actividad pero es a su vez el sustrato de otra enzima que hidroliza el dipéptido histidil-leucina y lo convierte en el octapéptido llamado angiotensina II. Esta enzima se denomina enzima convertidora de angiotensina (ECA) y es una metaloproteasa de Zn^{+2} que se produce fundamentalmente en el riñón y pulmón. La angiotensina II se transforma en angiotensina III por fenómenos de hidrólisis aminoacídica. La angiotensina II eleva la presión arterial al interactuar con sus receptores de membrana específicos localizados en los vasos sanguíneos creando vasoconstricción. Por otro lado, la angiotensina II como la III estimulan la liberación de aldosterona, la hormona encargada de regular el equilibrio electrolítico de los fluidos corporales promoviendo la excreción de iones potasio y la retención de sodio y agua con el consiguiente efecto vasopresor. Además, la angiotensina I también cataliza la hidrólisis de otro péptido que es un potente vasodilatador: la bradiquidina cuya inhibición se traduce en la prolongación del tiempo de acción de este péptido y, por tanto, de la vasodilatación.

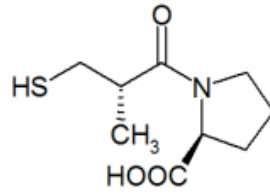


Figura 2. Estructura química del IECA Captopril.

1.2 Ácido Gamma-Aminobutírico como compuesto bioactivo

El ácido gamma aminobutírico o GABA es un aminoácido no proteico de cuatro carbonos (Figura 3) presente en bacterias, hongos, levaduras, vertebrados y plantas. Fue descubierto por primera vez en 1950 en tejido cerebral (Schousbe & Waagepetersen, 2008). En plantas y bacterias juega un papel metabólico en el ciclo de Krebs y en vertebrados es un potente neurotransmisor. El GABA se forma mediante la reacción irreversible de descarboxilación del L-glutamato la cual es catalizada por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD; EC 4.1.1.15). Esta enzima a su vez es dependiente del piridoxal 5' fosfato o Vitamina B₆ que actúa como cofactor (Figura 3) y se encuentra ampliamente distribuida entre el reino eucariota y el procariota (Ueno, 2000).

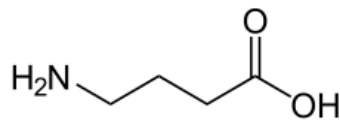


Figura 3. Fórmula estructural del Ácido γ -Aminobutírico (GABA).

Este aminoácido actúa en el cerebro de mamíferos como neurotransmisor de tipo inhibitor uniéndose a receptores específicos de las membranas plasmáticas tanto en procesos neuronales pre-sinápticos como en post-sinápticos. Se encuentra en grandes concentraciones en el cerebelo y menores concentraciones en el tálamo e hipocampo. Las alteraciones en estos circuitos GABAérgicos están asociadas con la enfermedad de Corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la demencia senil, la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia (Seidl et al., 2001; Okada et al., 2000).

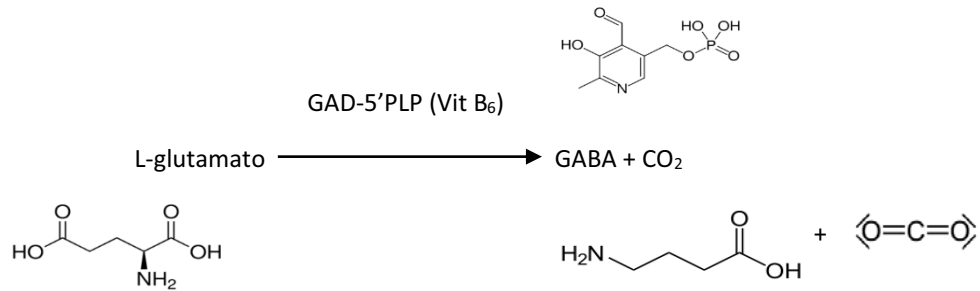


Figura 4. Reacción de descarboxilación del L-glutamato a GABA catalizado por la enzima Glutamato Descarboxilasa (GAD) que es dependiente del cofactor piridoxal 5-fosfato o Vitamina B₆.

El GABA es metabolizado mediante la transaminasa gamma-aminobutirato, que también es dependiente de la enzima piridoxal-5-fosfato, formándose el succinato semialdehído como metabolito intermediario. Este metabolito puede ser luego reducido a gamma-hidroxi-butirato u oxidado a succinato y eventualmente convertido a dióxido de carbono y agua a través del ciclo del ácido cítrico (Figura 5).

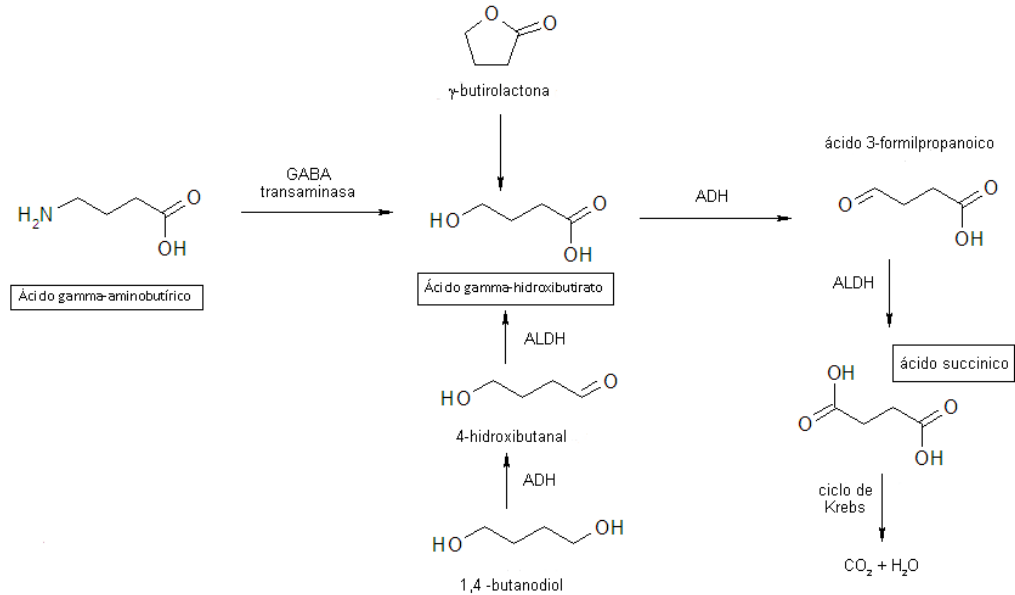


Figura 5. Metabolización del GABA en mitocondrias y citoplasma. ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa.

Las bacterias ácido lácticas (Maras et al., 1992; Smith et al., 1992) y las levaduras (Hao & Schmit 1993) son los organismos productores de GABA más importantes porque resultan comercialmente útiles como estárteres en alimentos fermentados.

1.2.1 Función del ácido gamma-aminobutírico (GABA) para el tratamiento de la hipertensión arterial

El GABA actúa a nivel cardiovascular regulando la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Mody et al., 1994). La función del GABA como reductor de la presión arterial reside en la inhibición de la liberación de noradrenalina a través de la activación en los receptores pre-sinápticos. La noradrenalina es liberada por la médula suprarrenal en el torrente sanguíneo como una hormona y también es un neurotransmisor en el sistema nervioso central y sistema nervioso simpático. Las acciones de la noradrenalina se llevan a cabo a través de la unión de los receptores adrenérgicos, los cuales se activan y producen una respuesta de vasoconstricción y una subida de la presión arterial al aumentar el tono vascular. Al inhibir el GABA la liberación de noradrenalina se contrarrestan los efectos citados. A nivel del sistema renina-angiotensina (RAS) o sistema renina-angiotensina-aldosterona cuyo sistema hormonal ayuda a regular la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal, el GABA actúa inhibiendo la ECA (secretada por las células endoteliales de los pulmones fundamentalmente, y de los riñones). Tal y como se ha detallado en el punto 1.1.3 esta enzima cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, cuyo efecto es la secreción de la hormona aldosterona que actúa en la conservación del sodio, secretando potasio y aumentando la presión arterial (Figura 4). Otros inhibidores ECA son el captopril, el enalapril, el lisinopril y el ramipril que, por un lado, conllevan una producción reducida de angiotensina II a partir de la angiotensina I, por el otro, inhiben la eliminación de bradiquinina provocando su acumulación. Estos compuestos se usan en aplicaciones farmacológicas y, en la actualidad, una de las familias más estudiadas son los péptidos bioactivos procedentes de la fermentación de productos lácteos. De hecho, ya existen productos registrados en el mercado como Evolus® o Calpis® que se añaden a productos comerciales del tipo yogur (por ej., Danaten®) para la reducción de la tensión arterial.

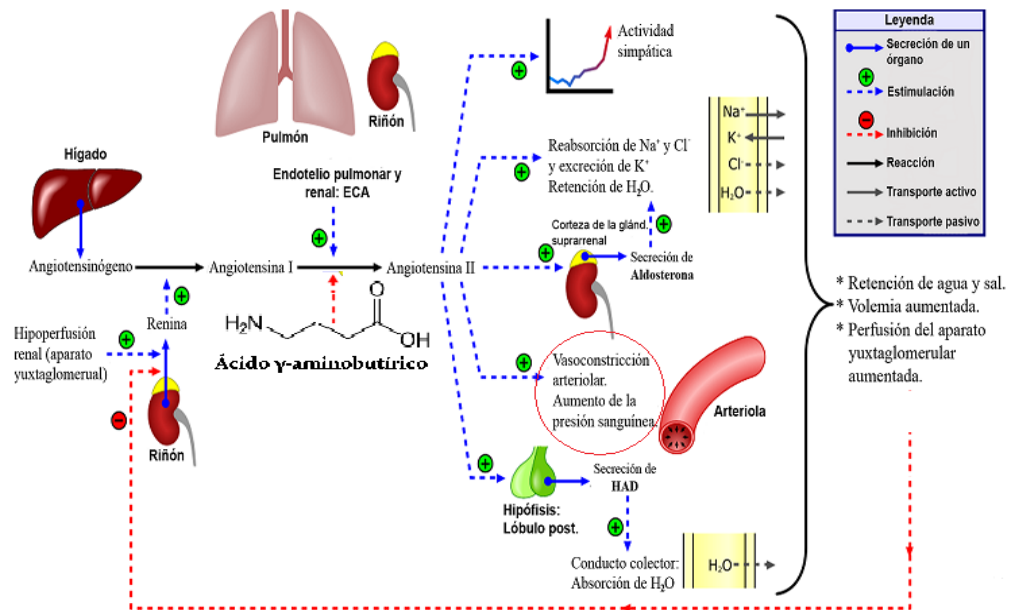


Figura 6. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. La figura muestra el punto de acción del GABA.

Numerosos estudios han evidenciado que el GABA es capaz de disminuir la elevación de la presión arterial en animales así como en humanos (Tabla 4). La presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en humanos hipertensos disminuye en respuesta al consumo de alimentos ricos en GABA tal y como mostraron Hayakawa et al. (2004) y Kajimoto et al. (2004), respectivamente. La PA y la frecuencia cardíaca disminuyeron a través de la inyección directa de GABA (50-200 μg) en ratas (Sasaki et al., 1986). Además, una salsa de soja enriquecida en GABA causó una reducción de la PAS tras 6 semanas de ingesta (Yamakoshi et al., 2007). Otro producto basado en la soja y enriquecido en GABA resultó eficiente para la reducción de PA en SHR (Aoki et al., 2003). El efecto reductor de la PA con haba de soja enriquecida en GABA fue también demostrado por Shizuka et al., 2004. Además, Abe et al., (1994) publicó que el té verde rico en GABA disminuye la PA en ratas sensibles a la sal. Extractos de hoja de morera y de alga roja (Porphyra) que contenían GABA redujeron la presión sanguínea en SHR (Yang et al., 2011; Umekawa et al., 2008). Una única administración de patata 'snack' enriquecida en GABA (1.7 mg/kg P.C) tuvo un efecto reductor en ratas normotensas (Noguchi et al., 2007), y un reciente artículo publicó que una dosis de leche fermentada de boniato tuvo un efecto antihipertensivo en SHR (Tsai et al., 2013).

En el ensayo de intervención humana de Shimada et al. (2009) se utilizó un suplemento dietético de algas rico en GABA y en el de Inoue et al. (2003), leche fermentada rica en GABA. En este último trabajo, una dosis de 10-12 mg/día de GABA redujo significativamente la presión sistólica y diastólica en pacientes hipertensos. También, 50 gramos de queso enriquecido en GABA (conteniendo 16 mg de GABA) disminuyó en 5.5 mm Hg la PAS en hombres (Pouliot-Mathieu et al., 2013). En un estudio de una única administración, un tratamiento con tomate de cultivo enriquecido en GABA provocó una

disminución significativa en PAS comparado con un grupo control (Yoshimura et al., 2010). Además una especie de seta (*Agaricus blazei*) con niveles elevados de GABA mostró un efecto antihipertensivo en humanos semi-hipertensos (Watanabe et al., 2003). Una suplementación dietética de 80 mg de GABA también redujo la PA en adultos semi-hipertensos (Matsubara et al., 2002). Otros autores han sugerido que el consumo diario de una porción (30 gramos) de cereales del desayuno enriquecidos en GABA disminuye la PA (Joye et al., 2011).

Tabla 4. *Algunos ensayos del uso de GABA como agente hipotensor.*

a) *en ratas*

Matriz de ingesta	Dosis de GABA	Referencia
Leche fermentada	0,5 mg	Hayakawa et al., 2004
Inyección directa	50-200 µg	Sasaki et al., 1996
Bebida de soja	1,36 mg/Kg PC/día	Liu et al., 2011
Salsa de soja	0,33 ml/Kg PC (conteniendo 1% de GABA)	Yamakoshi et al., 2007
Soja fermentada similar al tempeh	nr	Aoki et al., 2003
Polvos de soja	0,15%	Shyzuka et al., 2004
Té verde	4 mg	Abe et al., 1994
Extracto acuoso de hojas de morera	2-20 mg/Kg PC	Yang et al., 2012
<i>Snack</i> de patata	1,7 mg/Kg PC	Noguchi et al., 2007
Leche fermentada de camote morado	60 µg-600 µg GABA/ ml	Tsai et al., 2013
Tomate	2 y 10 g tomate/Kg PC (conteniendo un 180% de GABA)	Yoshimura et al., 2010

PC, peso corporal; nr, no reportado

b) en humanos

Matriz de ingesta	Dosis de GABA	Referencia
Leche fermentada	nr	Kajimoto et al., 2004
Leche fermentada	100 ml (conteniendo 10-12 mg de GABA)	Inoue et al., 2003
Queso	50 mg (conteniendo 16 mg de GABA)	Pouliot-Mathieu et al., 2013
Alga	20 mg	Shimada et al., 2009
Champiñón (<i>Agaricus blazei</i>)	nr	Watanabe et al., 2003
Suplementación dietética	80 mg	Matsubara et al., 2002
Cereales	30 g (conteniendo 66 ppm)	Joye et al., 2011
Vinagre y agua de bonito seco	70 mg	Tanaka et al., 2009

nr, no reportado

1.2.2 Otras funciones fisiológicas del GABA

En animales, el GABA se encuentra en altas concentraciones en el cerebro y actúa como neurotransmisor de tipo inhibitor en varias rutas del sistema nervioso central y periférico (DeFeudis, 1981). Una de estas alteraciones puede ser causada por una baja concentración de GABA en el cerebro lo cual se ha observado en pacientes con Alzheimer (Seidl et al., 2001). El grupo de Okada et al., (2000) demostró que la administración oral diaria de germen de arroz enriquecido en GABA resultaba efectivo en el tratamiento de estas enfermedades neuronales. Por otro lado, la práctica de yoga *asana* incrementa los niveles de GABA en el cerebro convirtiéndose en un potente tratamiento para algunas enfermedades autonómicas observadas en periodos menopáusicos y seniles (Streeter et al., 2007). Otras funciones fisiológicas como el efecto relajante (Wong et al., 2003), el insomnio y la depresión (Okada et al., 2000) han sido tratadas con GABA. Este compuesto bioactivo sirve también para proteger enfermedades crónicas de riñón, mejorar el estrés oxidativo por nefrectomía (Sasaky et al., 2006) y puede actuar activando las funciones del riñón (Sun, 2004). El GABA aumenta también la inmunidad frente condiciones de estrés tras una hora de suministro en humanos (Abdou et al., 2006). Además, el GABA puede resultar útil para la prevención y tratamiento del alcoholismo (Oh et al., 2003) y contribuye a incrementar la concentración de la hormona del crecimiento en plasma y la frecuencia de la síntesis de proteína en el cerebro (Tujioka et al., 2009). Estudios recientes han indicado que el GABA puede ser un potente segregador de insulina lo que podría ayudar a prevenir la diabetes (Adeghate et al., 2002). Por otro lado, el GABA también podría retardar o inhibir la invasión y metástasis de varios tipos de células cancerígenas como las de la glándula mamaria, colon y páncreas (Kleinrok et al., 1998; Minuk, 2000; Opolski et al., 2000). El consumo de arroz integral enriquecido en GABA puede inhibir la proliferación de células leucémicas y estimular la apoptosis de células cancerosas (Oh & Oh, 2004). El GABA también ha sido considerado como supresor potencial tumoral para adenocarcinomas de vías

respiratorias derivadas del pulmón (Schuller et al., 2008). Además, se han mostrado actividades de anti-inflamación y proliferación de fibroblastos celulares que promueve el proceso de curación en heridas cutáneas (Han et al., 2007). Este aminoácido está también implicado en el mantenimiento de la homeostasis celular bajo la radiación UV (Warskulat et al., 2004), en la síntesis de ácido hialurónico y la mejora de la tasa de fibroblastos dérmicos expuestos a agentes de estrés oxidativo (Ito et al., 2007) lo que hace del GABA una aplicación novedosa con fines dermatológicos (Di Cagno et al., 2010). Adicionalmente, el GABA puede reducir la inflamación de artritis reumatoide (Kelly et al., 2008) y atenuar la respuesta metabólica a los accidentes isquémicos (Abel & McCandless, 1992). También tiene efectos sobre el control del asma (Xu & Xia 1999) y la respiración (Kazemi & Hoop, 1991).

Varios artículos han informado de la relación entre los trastornos del estado de ánimo y el GABA. Bajas concentraciones de GABA en el plasma puede representar un marcador biológico de la vulnerabilidad para el desarrollo de diversos trastornos del estado de ánimo. Como Frederick Petty (1994) demostró, las concentraciones plasmáticas de GABA resultaron significativamente inferiores a los valores de control en pacientes con trastorno depresivo, manía o depresión bipolar. El grupo de Krystal et al., (2002) demostró que niveles normales de GABA son representativos de los tratamientos antidepresivos eficaces y del control de las convulsiones lo cual supone un *target* para el tratamiento del trastorno bipolar. Además, los niveles de GABA en plasma pueden correlacionarse con la agresividad en algunos pacientes con depresión, maníacos y alcohólicos (Bjork et al., 2001). Existe una relación entre la progesterona, el GABA y el comportamiento del estado de ánimo en las mujeres (Rapkin, 1999). La secreción hormonal puede ser también regulada por el GABA (Parkash & Kaur, 2007). Por otra parte, existe evidencia clínica sobre la regulación de las hormonas tiroideas y los sistemas GABAérgicos (Wiens & Trudeau, 2006). Otros estudios han sugerido la posibilidad del GABA en la mejora de la función visual en animales senescentes (Leventhal et al., 2003) e incluso en mejorar la memoria (Kayahara & Sugiura, 2001). Finalmente, también hay evidencia del GABA actuando como una señal entre células eucariotas y bacterias patógenas controlando el nivel de detección de señal (*quorum sensing*) (Chevrot et al., 2006).

Todas estas funciones fisiológicas (Tabla 5) dan lugar a una fuerte demanda de la producción del GABA a través de los alimentos enriquecidos en este aminoácido, siendo la vía más natural y barata del consumo regular de GABA.

1.2.3 Síntesis de ácido gamma-aminobutírico por bacterias lácticas

La adición química de GABA resulta poco natural y entraría dentro del campo farmacéutico, por lo que resulta necesario encontrar métodos innovadores para producir e incrementar las concentraciones de GABA en alimentos. La producción de GABA por parte de las BAL resulta de especial interés para su aplicación en alimentos o ámbitos biotecnológicos. Se han publicado un amplio rango de concentraciones de GABA producidos por BAL. Las especies de *Lactobacillus brevis* PM17, *L. plantarum* C48, *L. paracasei* PF6, *L. delbrueckii sbsp. bulgaricus* PR1 y *Lactococcus lactis* PU1 aislados de diferentes tipos de quesos produjeron concentraciones de entre 15 a 63 mg/kg en diferentes medios de cultivo (Siragusa et al., 2007). Entre las especies de *Lactobacillus brevis*, *L. brevis* OPY-1 y

L. brevis OPK-3, aisladas de *kimchi* (verdura fermentada típica de corea) produjeron 0,825 g/L y 2,023 g/L, respectivamente (Park and Oh, 2005; 2007a). *L. brevis* NCL912 aislada de *Pao cai* (calabaza encurtida china) produjo 35,66 g/L (Li et al, 2009b) y *L. brevis* GABA057, 23,40 g/L. Además, *L. brevis* GABA100 produjo 27,6 mg/ml en jugo de frambuesa (Kim et al., 2009) y *L. brevis* BJ20 2,465 mg/L en una solución fermentada de laminaria (Lee et al., 2010). *L. brevis* IFO 12005 produjo 1,049 g/L (Yokoyama et al., 2002) y, recientemente, Diana et al., (2013) encontraron 1000 mg/L de producción de GABA en la especie *L. brevis* CECT8183 aislada de un queso curado artesanal español. La especie *L. brevis* CGMCC1306 aislada de leche fresca produjo una de las concentraciones más elevadas encontradas (76,36 g/L) (Huang et al., 2007). Pero existen muchas más publicaciones que muestran la producción de GABA por parte de diferentes cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de *kimchi* (Cho et al., 2007; Seok et al., 2008; Lu et al, 2008), *koumiss* (Sun et al., 2009), estárter de queso (Nomura et al., 1998), pez lengüeta fermentado de Myanmar (Su et al., 2011), bebida de algas rojas (Ratanaburee et al., 2011), masas madre de trigo integral (Rizello et al., 2008), intestinos humanos y caries dentales (Barret et al., 2012), hojas de zanahoria (Tamura et al., 2010), *sushi* (Komatsuzaki et al., 2005), etc. Esta actividad tan alta para producir GABA por parte de las BAL viene dada por el alto efecto de la enzima GAD presente en las células. Por otro lado, la concentración de ácido glutámico en la matriz del alimento debe ser lo suficientemente alta. En consecuencia, las BAL productoras de GABA son potencialmente relevantes para el desarrollo de productos fermentados orientados a promover la salud humana.

1.2.4 Síntesis de ácido gamma-aminobutírico por otros microorganismos y plantas

En base a la dificultad de la extracción debido al bajo contenido de GABA en tejidos biológicos naturales y que la síntesis química no tiene aceptación popular a causa del uso de reactivos corrosivos, la capacidad de producir GABA por parte de especies/subespecies de BAL y la presencia de la actividad de la enzima GAD en sus células han sido ampliamente estudiado.

Aunque las bacterias ácido lácticas son los microorganismos productores de GABA más estudiados, una gran variedad de organismos fúngicos contienen GABA en sus estructuras celulares. Se han encontrado altos contenidos de GABA en hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, *A. niger* y *Neurospora crassa* (Kubicek et al., 1979; Schmit & Brody, 1979). Otros hongos como *Monascus purpureus* ha mostrado producir GABA en arroz y otros medios de cultivo nutritivos (Jannoy et al., 2010; Su et al., 2003) y dos cepas de *Rhizopus microspores* produjeron altos niveles de GABA en soja fermentada (Aoki et al., 2003). Además, algunas cepas fúngicas aisladas del mar también han demostrado su capacidad de producir GABA. Entre ellas, una cepa de *Candida* y tres de *Pichia* aisladas del océano pacífico del Japón (Guo et al., 2009). Otras 4 cepas pertenecientes al género *Saccharomyces* de la misma colección marina mostraron alta capacidad de producción del aminoácido (Masuda et al., 2008). También mostró esta habilidad una especie de *Pseudomona* aislada de ambientes marinos (Mountfort & Pybus, 1992).

Tabla 5. *Funciones fisiológicas del GABA.*

Función fisiológica	Función específica	Referencia
Neurotransmisor	-Neurotransmisor inhibitor	Battaglioli et al., 2003; DeFeudis, 1981
Regulador de la presión arterial	-Potente agente hipotensor	Abe et al., 1995; Aoki et al., 2003; Hayakawa et al., 2004; Inoue et al., 2003; Joye et al., 2011; Kajimoto et al., 2004; Matsubara et al., 2002; Noguchi et al., 2007; Pouliot-Mathieu et al., 2013; Sasaki et al., 1996; Shimada et al., 2009; Tsai et al., 2013; Yamakoshi et al., 2007; Yang et al., 2012; Yoshimura et al., 2010; Wang et al., 2010; Watanabe et al., 2003.
Enfermedades cerebrales	-Trastornos neuronales -Aumenta la memoria	Okada et al., 2000; Seidl et al., 2001 ; Wong et al., 2003 Kayahara & Sugiura , 2001
Enfermedades psiquiátricas	-Trastornos del estado anímico -Efecto relajante -Acción contra el insomnio -Antidepresivo -Prevención y tratamiento del alcoholismo	Bjork et al., 2001; Krystal et al., 2002 Wong et al., 2003 Okada et al., 2000 Krystal et al., 2002; Okada et al., 2000 Bjork et al., 2001; Oh et al., 2003a
Órganos vitales	-Acción para la enfermedad crónica del riñón -Activa funciones hepáticas -Aumenta la función visual -Incrementa la tasa de proteína en el cerebro	Sasaky et al., 2006; Sun, 2004 Sun, 2004 Leventhal et al., 2003 Tujioka et al., 2009
Sistema inmune	-Incrementa el sistema inmune	Abdou et al., 2006
Protector contra el cáncer	-Retrasa y/o inhibe la proliferación de células cancerosas. -Acción estimuladora en la apoptosis de células cancerosas. -Potente supresor tumoral	Kleinrok et al., 1998; Minuk, 2000; Opolski et al., 2000 Oh & Oh, 2004 Schuller et al., 2008
Regulador celular	-Mantiene la homeostasis del volumen celular -Anti-inflamación y proliferación celular de fibroblastos -Síntesis de ácido hialurónico -Aumenta la tasa de fibroblastos dermales -Señal <i>quorum sensing</i> entre células	Warskulat et al., 2004 Han et al., 2007 Ito et al., 2007 Ito et al., 2007 Chevrot et al., 2006
Protector de ECV	-Reduce la inflamación en artritis reumatoide -Atenúa la respuesta metabólica a las incidencias isquémicas	Kelly & Saravanan, 2008 Abel & McCandless, 1992
Enfermedades respiratorias	-Control en asma -Control en respiración	Xu & Xia, 1999 Kazemi & Hoop, 1991
Regulador hormonal	-Incrementa la hormona de crecimiento -Regulación de la secreción hormonal -Regulación de la progesterona -Regulación de la hormona tiroidea -Potente segregador de insulina	Tujioka et al., 2009 Parkash & Kaur, 2007 Rapkin, 1999 Wiens & Trudeau, 2006 Adeghate et al., 2002

ECV, enfermedades cardiovasculares

Aparte de las bacterias ácido lácticas, el género bacteriano *Streptomyces* aislado del té también ha mostrado capacidad de producir GABA en un medio de cultivo (Jeng et al., 2007) y cepas fecales de *Escherichia coli* mostraron capacidad de sintetizar GABA, sugiriendo que el colon es una fuente potencial del compuesto bioactivo (Mardini et al., 2014).

Por otro lado, el papel del GABA en las plantas es poco conocido aunque es bien sabido que las plantas responden a los cambios de concentración de GABA a causa de condiciones adversas (disrupciones metabólicas y/o mecánicas, anoxia, frío, calor, condiciones salinas, aire, lluvia, etc.) y durante la infección fúngica (Solomon & Oliver, 2002). Por ejemplo, en respuesta al choque por frío o a una estimulación mecánica, los niveles de GABA en las raíces de la planta de soja incrementaron de 20 a 40 veces en 5 minutos de 1 a 2 $\mu\text{moles/g}$ de peso fresco (Wallace et al., 1984). El GABA está incluso involucrado en el desarrollo y/o diferenciación de los procesos metabólicos de las plantas (Gallego et al., 1995, Chen et al., 1994) y en la reproducción (Yang, 2003). Por otro lado, es sabido que la acumulación de GABA en plantas es importante para la regulación del pH ya que la enzima GAD se activa cuando se incrementan los niveles citosólicos de H^+ o Ca^{2+} . El almacenamiento de GABA es también útil para la defensa de las plantas contra insectos fitófagos y resulta una alternativa del uso del ácido glutámico. Se han propuesto técnicas y condiciones de cultivo para la acumulación de GABA en plantas, especialmente en habas germinadas (Li et al., 2009) y en arroz integral germinado (Banchuen et al., 2009; Oh, 2003).

1.2.5 Mecanismos y técnicas para aumentar la síntesis de ácido gamma-aminobutírico

Existe un amplio conocimiento acerca las múltiples funciones fisiológicas del GABA y debido a esto, el desarrollo de alimentos funcionales ricos en GABA han sido activamente demandados (Tsushida & Murai, 1987; Saikusa et al., 1994). Los factores clave más importantes que afectan a la síntesis de GABA por microorganismos en medios de cultivo son el pH, la cantidad de su precursor (ácido glutámico o su sal) y otros aditivos como fuentes de carbón o nitrógeno. Otros parámetros cultivables pueden ser optimizados a través de las propiedades bioquímicas de la enzima GAD. El pH óptimo para la actividad glutamato descarboxilasa es estrictamente dependiente de la especie. Por ejemplo, el pH óptimo para *Escherichia coli* es 3,8 mientras que para *Neurospora crassa* y *Lactobacillus brevis* es 5,0 y 4,2, respectivamente (Yang et al., 2006). Por otro lado, el pH en medios fermentativos cambia con el tiempo, por eso, debe estar ajustado manteniendo la producción de GABA más eficientemente (Li et al., 2010). Varios autores han publicado como la adición de glutamato incrementa el rendimiento del GABA en diferentes medios de cultivo (Hayakawa et al., 1997; Huang et al., 2007; Komatsuzaki et al., 2005; Li et al., 2010) aunque la respuesta es diferente entre especies (Yang et al., 2008). De manera semejante, el piridoxal 5'fosfato (PLP) usado como coenzima para elevar la actividad GAD, ha mostrado incrementar la producción de GABA durante la fermentación en algunas cepas (Coda et al., 2010; Komatsuzaki et al., 2005; Yang et al., 2008). En cambio, no se mostró ningún efecto en una fermentación de mosto de uvas, principalmente debido a la propia producción de PLP por algunas cepas (Di Cagno et al., 2010). Durante la última década, se han desarrollado técnicas de ingeniería genética para mejorar la síntesis de GABA. Una cepa de *Bacillus* fue usada para aumentar el GABA en un

producto coreano basado en haba de soja germinada a través de la expresión de la enzima GAD de una cepa de *Lactobacillus brevis* (Park & Oh, 2006). Del mismo modo, el gen de la enzima GAD fue aislado de una cepa de *Lactobacillus plantarum* para ser recombinado en una cepa de *Lactobacillus kasei* aislada de *kimchi* (una verdura fermentada de origen coreano) (Kook et al., 2010). Otra cepa bacteriana, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, fue también genéticamente modificada para sintetizar GABA usando glutamato endógeno de la cepa *Lactobacillus brevis* (Shi & Li, 2011). Otro sistema nuevo y eficiente para elevar los niveles de GABA en medios de cultivo es la co-cultivación de especies productoras de GABA. Tal y como Watanabe et al., (2011) publicaron, dos especies cultivadas separadamente produjeron menos de 5 mM de GABA; por contra, cultivando ambas cepas juntas, el contenido de GABA incrementó hasta 15 mM. Por otro lado, la tecnología de inmovilizar células es una técnica que ha mostrado ser muy útil para optimizar la producción de GABA. La técnica consiste en atrapar las células altamente productoras de GABA en bolas de gel de calcio y alginato (Huang et al., 2007). Otro método tecnológico muy eficiente a gran escala fue propuesto por Shu-Cong et al., (2010), el cual consistió en obtener el máximo rendimiento de la tasa de recuperación de la bioconversión del L-glutamato a GABA por la cepa *Lactobacillus plantarum* GB01-21 para la producción industrial de GABA.

1.3 Alimentos enriquecidos en GABA

El GABA se encontró como un constituyente de tejido de tubérculo en patata (Steward et al., 1949) y actualmente se encuentra naturalmente presente en pequeñas cantidades en muchas plantas: en verduras como las espinacas, patatas, espárragos, repollo (brócoli) y tomates; en frutas, como las manzanas y las uvas; y en los cereales, por ejemplo, cebada y/o maíz (Oh et al., 2003). Recientemente, Pradeep et al., (2011) sugirió que los germinados y las legumbres son una buena fuente de GABA lo cual indica el posible desarrollo de alimentos funcionales a base de cereales, especialmente para los niños y ancianos. La mayor cantidad de GABA se encuentra principalmente en los productos fermentados, especialmente en los productos lácteos fermentados (Hayakawa et al., 2004), salsas de soja (Yamakoshi et al., 2007) y los quesos (Siragusa et al., 2007). En general, el cuerpo humano es capaz de producir su propio suministro. Sin embargo, la producción de GABA a veces se inhibe por la falta de estrógeno, zinc o vitaminas, o por un exceso de ácido salicílico y aditivos alimentarios (Aoshima, & Tenpaku, 1997). De hecho, se requiere una alimentación rica en GABA debido a que el contenido de GABA en la dieta humana diaria típica es relativamente bajo (Oh et al., 2003).

1.3.1 Masas madre de pan y otros alimentos basados en el cereal

Uno de los productos alimenticios más ampliamente enriquecidos en GABA son los relativos al cereal. Numerosos estudios han reportado el uso potencial en masas madre de BAL seleccionadas que resultan en una masa madre enriquecida en GABA con la posibilidad de mejorar el contenido de GABA en la fabricación de pan final. Rizzello et al., (2008) informaron de la síntesis elevada de GABA (258,7 mg/kg) en una masa madre de trigo integral utilizando BAL seleccionadas en comparación con otras masas madre de harinas de trigo blanco o harinas de centeno. Una amplia variedad de cereales, pseudo-cereales y harinas de leguminosas con cepas productoras de GABA bien caracterizadas se han utilizado para hacer pan de masa madre enriquecido en GABA (504 mg/kg) elaborado con una mezcla de las harinas de cereales más apropiados para ser enriquecida de GABA (garbanzo, amaranto, quinoa y trigo sarraceno) (Coda et al., 2010). El mayor contenido de GABA encontrado fue en pan de masa fermentada llamado *Bathura* (226,22 mg/100g) (Bahnwar et al., 2012), seguido de otro pan enriquecido en GABA (115 ppm) realizado con la suplementación exógena de GAD producido por la forma recombinante de *Yersinia intermedia* (Lamberts et al., 2012). Otro estudio mostró que los copos de cereales enriquecidos en GABA y la optimización de los procesos con la inclusión de salvado, la quinoa o harina de malta que se tradujo en un nivel de GABA de 66 ppm, 90 ppm y 258 ppm, respectivamente (Joye et al., 2011). La fermentación de avena por una cepa de hongos (*Aspergillus oryzae*) dio lugar a una mayor cantidad de GABA en el producto (435,2 mg/g) (Cai et al., 2012). Por otra parte, mediante la manipulación de las condiciones de germinación, las concentraciones de GABA se han optimizado en diferentes tipos de cereales. Nagaoka (2005) obtuvo el germen de trigo rico en GABA (163 mg/100 g) y se alcanzaron 9,2 mM en un salvado de cebada bajo reacciones óptimas (Ji et al., 2013). La máxima producción de GABA optimizado (42,9 mg/100g) fue acumulado en mijo (Bai et al., 2008) y se obtuvo una cantidad de 14,3 mg/100g en cebada germinada bajo condiciones controladas (Chung et al., 2009). Por último, durante la última década, el arroz ha sido una matriz interesante para el enriquecimiento en GABA. Del arroz integral germinado se obtuvo 10 veces más cantidad de GABA en comparación con el arroz blanco molido y 2 veces más que la del arroz pardo (Patil y Khan, 2011) y más aún en parámetros controlados, tales como inmersión en agua (Saikusa et al, 1994). El enriquecimiento de GABA en arroz integral fue logrado también mediante hidrólisis proteolítica (2,26 g/100g) y por el tratamiento de la presión alta (Zhang et al., 2006; Kinefuchi et al., 1999). Un arroz glutinoso fermentado rico en GABA (*Laozao*) fue desarrollado por la fermentación con una cepa de *Rhizopus* a 28,5 °C durante 48 horas (Dai-xin et al., 2008). Además, el GABA ha sido analizado en diversos cereales como el germen de arroz, brotes de arroz integral, brotes de cebada, brotes de soja, frijoles, maíz, cebada y arroz integral en las que se mostraron las concentraciones de 718 , 389 , 326, 302 , 250, 199 , 190, y 123 nmol/g de peso seco, respectivamente (Oh et al., 2003).

1.3.2 Productos lácteos

El queso, el yogur y leche fermentada han sido los productos más estudiados para el enriquecimiento de GABA por acción de las BAL, muchos de ellos con potencial para el manejo de la hipertensión. El queso enriquecido en GABA (16 mg/50g) a través de la cepa *Lactococcus lactis spp lactis* mostró una reducción media la presión arterial de 3,5 mmHg (Pouliot -Mathieu et al., 2013). Otro queso tipo *cheddar* con una cepa probiótica mostró mayor nivel de GABA que el queso control (Wang et al., 2009). También se han obtenido yogures enriquecidos en GABA mediante diferentes procedimientos (Park & Oh, 2006). Una leche fermentada de forma artesanal en el Tíbet tuvo mayores niveles de GABA en comparación con un yogur comercial (Sun et al., 2009). Se han publicado numerosos estudios sobre los beneficios antihipertensivos del GABA en leche fermentada para ratas (Liu et al, 2011; Hayakawa et al., 2004) y humanos (Inoue et al, 2003; Nejati et al., 2013). Debido a una mezcla de BAL se alcanzó una concentración de GABA de 28 mg/kg en leche de cabra fermentada (Minervini et al., 2009) y se obtuvieron 500 mg/100ml en una leche fermentada por la acción de dos cepas de BAL aisladas de un queso artesanal (Lacroix et al., 2013). Además, se consiguió un rango de 15 a 99,9 mg/kg de GABA en una leche desnatada de varias cepas de BAL productoras aisladas de quesos italianos (Siragusa et al., 2007) y *L. helveticus* mostró buen potencial (113,35 mg/L) en una leche desnatada fermentada dando evidencia de la posible aplicación en el tratamiento de la hipertensión (Sun et al., 2008). Una dosis de 10 a 12 mg en 100 ml de una leche fermentada disminuyó de manera significativa la PA en un plazo de 2 a 4 semanas en un ensayo aleatorizado y controlado con placebo en pacientes levemente hipertensos (Inoue et al., 2003). También, una cepa de *Lactobacillus plantarum* produjo 77,4 mg/kg de GABA en una fermentación de leche y en combinación con otras BAL, el GABA alcanzó una concentración del doble (144,5 mg/kg) considerando esta dosis compatible para un posible efecto hipotensor (Nejati et al., 2013). La evidencia del efecto hipotensor del GABA ha sido incluso demostrada ampliamente en ratas a través de productos basados en leche fermentada. Una disminución significativa en la PA sistólica y diastólica en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se mostró en una leche descremada enriquecida en GABA (970 mg/L) fermentada por *L. plantarum* (Liu et al., 2011). La presión arterial también se redujo en SHR tras 8 semanas de administración oral de leche fresca baja en grasa enriquecida en GABA (80,6 mg/100g), fermentada con un mix de cinco bacterias lácticas y con proteasa añadida. Otra leche descremada mostró un efecto reductor de la PA en SHR y en ratas normotensas en dosis bajas (Hayakawa et al., 2004).

1.3.3 Verduras y legumbres

La carne, el pescado, los productos de soja y verduras son un grupo de alimentos que de forma fermentada también se usan para ser enriquecidos en GABA y se han propuesto varias técnicas para conseguirlo. Carnes (Dai et al., 2012) y piensos (Matsunaga et al., 2009) enriquecidos en GABA fueron publicados con el fin de aliviar el estrés animal y, posteriormente, ofrecer una carne nutritiva y de calidad. Salchichas fermentadas de cerdo también han sido enriquecidas en GABA gracias al uso de estárteres de BAL (Ratanaburee et al., 2013) o mediante proteasas de higo (Li et al., 2009), haciendo

que la carne tuviera un valor añadido. Además, un alto contenido de GABA fue detectado en un pescado fermentado tradicional del Japón (Kuda et al., 2009).

Verduras con alto contenido en GABA han sido la hoja de mostaza (Kim et al., 2013) y en plantas de crucíferas (Hattori et al., 2003). Los efectos de las verduras enriquecidas en GABA en el sistema nervioso autonómico cardíaco fue investigado en pacientes jóvenes poniendo de manifiesto los beneficios del GABA en la actividad simpática nerviosa (Okita et al., 2009). La fermentación ácido láctica en una planta de *Brassica* dio lugar a altas concentraciones de GABA apoyando la creación de un nuevo alimento funcional (Norimura et al., 2009). Las legumbres enriquecidas en GABA, especialmente habas, también han sido estudiadas. Recientemente, Liao et al., (2013) propusieron procesos específicos y condiciones de fermentación para el enriquecimiento de GABA en habas *adzuki* (comúnmente, frijol) ofreciendo así una nueva fuente natural de alimento funcional. También las habas pardas fueron usadas para producir una leche rica en GABA como candidato antidepressivo (Ko et al., 2013). Otros efectos estimuladores como la hipoxia y el estrés por sequía indican efecto en la actividad GAD, y por tanto, una acumulación de GABA en los nódulos de la planta de soja (Serraj et al., 1998). Además, recientemente, Torino et al., (2003) mostraron una alta concentración de GABA como compuesto antihipertensivo en lentejas fermentadas.

1.3.4 Otros alimentos

Otros productos alimenticios se han usado para elevar el contenido de GABA y proporcionar efectos saludables. El incremento de la concentración de GABA en tubérculos de patata con un efecto antihipertensivo en la ingesta de patatas tipo 'snack' (Noguchi et al., 2007) y el enriquecimiento en chocolate (28 mg de GABA en 10 g de chocolate) de proveer una reducción del estrés psicológico (Nakamura et al., 2009) se ha demostrado en ratas y humanos, respectivamente. Otro estudio mostró el contenido de GABA en 22 variedades de patata, el cual varió de 16 a 61 mg/100 g de peso fresco (Nakamura et al., 2006). La concentración de GABA ha sido incluso analizada en un buen número de productos alimenticios no cocinados. Alimentos con concentración de GABA en exceso de 100 nmol/g peso seco fueron: germen de arroz integral, arroz integral, brotes germinados de cebada, brotes de soja, frijoles, maíz, cebada, arroz integral, espinacas, patatas, batatas, ñames, la col rizada y las castañas. Los vegetales: espinacas, patatas, batatas, ñame y la col rizada contuvieron 414, 166, 137, 129, 122 nmol GABA/g peso seco, respectivamente. La concentración de GABA en castañas fue de 188 nmoles/g de peso seco (Oh et al., 2003).

1.3.5 Bebidas

Finalmente, diferentes tipos de bebidas enriquecidas en GABA han sido también publicadas. Entre ellas, los tés chinos han sido ampliamente estudiados. Un total de 114 muestras de 6 tipos diferentes de té fueron analizados y se concluyó que el té blanco posee una concentración de GABA más alta que otros tipos de té (Zhao et al., 2011). Los niveles de GABA en zumos pueden ser incrementados principalmente a través de la fermentación ácido láctica (Kim et al., 2008; Di Cagno et al., 2009; Hirose

et al., 2008; Song et al., 2013) o por procesos de cultivo específicos de la fruta (Tamura et al., 2009). Un experimento acerca la durabilidad del GABA en los zumos de fruta durante el almacenamiento a diferentes temperaturas y tras la radiación concluyó que el GABA permanece estable (Shawai & Shimizu, 2009). El efecto antihipertensivo y aliviador de la fatiga tras el consumo de bebidas con contenido de GABA fue demostrado en ratas (Hiwatashi et al., 2010) y en sujetos Japoneses (Kanehira et al., 2011), respectivamente. Además, una bebida fermentada con BAL a base de hojas de pimienta fue publicada como nuevo alimento funcional con capacidades antidiabéticas (Hiwatashi et al., 2010). Y también una bebida alcohólica japonesa mostró alto contenido en GABA gracias al buen crecimiento en el medio de una cepa láctica productora de GABA (Yokoyama et al., 2001).

1.4 Uso de masas madre para la elaboración del pan

La masa madre es una mezcla de harina y agua en la que las bacterias ácido lácticas producen junto con las levaduras su fermentación. La misma masa madre contiene levaduras naturales que permiten la hinchazón de la masa. No obstante, no existe una definición concreta de la masa madre pero en ella se incluye todo tipo de masas con bacterias lácticas vivas y excluye los productos de masa madre artificiales. Según Lönner et al., (1986) una masa madre debe contener más de 5×10^8 BAL/g metabólicamente activas y tener un pH por debajo de 4,5. Las ventajas del uso de la masa madre (Tabla 6) en la elaboración del pan incluye la posibilidad de fermentar y/o inflar la masa sin necesidad de añadir levaduras comerciales, incrementar las propiedades de la masa, y alcanzar un pan más aromático y con mejor textura comparado con un pan fermentado únicamente con levadura comercial. El *flavor* de la masa madre se desarrolla en un largo tiempo de fermentación de 12 a 24h, mientras que la fermentación con levadura comercial finaliza en sólo 1 o 2 horas. La adición de masa madre extiende la vida útil del producto final incrementando el periodo libre de hongos y retrasando el deterioro del pan. Todo ello se debe a dos fenómenos que ocurren simultáneamente dentro de la masa: por una parte a la formación de ácidos, fundamentalmente láctico y acético, y por otra a la proteólisis que genera una gran cantidad de aminoácidos, una fracción de los cuales, a través del propio metabolismo de las levaduras y/o bacterias lácticas, se convertirán en alcoholes y cetonas con elevado valor aromático (Gäntzle et al, 2008). Desde un punto de vista nutricional, es conocido que los panes ácidos tienen un valor nutricional más elevado que los panes convencionales debido a la mayor disponibilidad de minerales libres ya que son separados del ácido fítico durante el largo proceso fermentativo. Además los panes de masa madre dan lugar a Índices Glicémicos (IG) menores que los panes convencionales. Ello es debido al mayor tiempo de tránsito en el estómago, lo que modifica la respuesta glicémica, así como a la mayor interacción del almidón con el gluten y, por tanto, la menor disponibilidad del mismo a la acción de las amilasas (Fardet, 2006).

Tabla 6. *Ventajas del uso de la masa madre en la elaboración del pan.*

Leudado natural de la masa
Incrementa las propiedades de la masa
Inhibición de la α -amilasa
Incrementa el sabor y aroma del pan
Incrementa el valor nutricional de los panes
Biodisponibilidad de minerales
Menor índice glucémico
Extiende la vida útil del pan
Mayor periodo libre de hongos
Prevención del deterioro
Antienvejecimiento

1.4.1 Historia

El pan, en todas sus formas, es uno de los alimentos básicos de la dieta. Durante miles de años, los granos de cereales y las muchas variedades de pan han sido y siguen siendo elementos esenciales en la nutrición humana. En los últimos 5.000-6.000 años, la mayor parte de trigo consumido por humanos ha sido en forma de pan fermentado, y hasta hace muy poco el pan se elaboraba en base a las masas madres o *sourdough* (en inglés). Así, en muchos aspectos, la historia de la masa madre ha sido despreciada pero constituye, en sí misma, una importante faceta del desarrollo de la civilización. La masa madre es originaria del antiguo Egipto, datada alrededor del 1500 DC; los egipcios tenían 50 tipos de bollos, panes sin fermentar y panes fermentados con espuma de cerveza o masas madre (Jacob, 1994). Las masas madre se siguieron usando hasta la Edad Media Europea, hasta que fueron reemplazadas por la levadura de cerveza en procesos de cervecería y más tarde llegó el cultivo de levadura propiamente dicho. Tradicionalmente, las masas madre se elaboraban con harinas pardas o integrales, debido a la falta de tecnología de molienda de granos para la producción de harinas refinadas. Los panaderos franceses adquirieron las técnicas de masas madre del norte del estado de Carolina durante la fiebre del oro de California, caracterizado por la llegada masiva de inmigrantes a las cercanías de San Francisco (Estados Unidos, 1845-1855). Dichas técnicas continúan siendo, a día de hoy, parte de la cultura de la ciudad. La masa madre ha sido asociada a los buscadores de oro del 1845 aunque estos eran más propensos a hacer pan con levadura comercial o bicarbonato de sodio. La ‘masa madre’ es un apodo usado en el norte de América (Yukon, Alaska) de alguien que pasó todo un invierno en el Círculo Polar Ártico y se refiere a su tradición de proteger su masa cerca de su cuerpo durante los meses más fríos. La tradición de la masa madre se mantuvo en Alaska y en el este de Canadá. Las levaduras convencionales y el bicarbonato de sodio eran mucho menos fiables en las condiciones que enfrentaban

los buscadores durante la fiebre del oro. Mineros experimentados y otros colonos llevaban con frecuencia una bolsa de masa prefermentada, ya fuera en el cuello o en el cinturón, que eran protegidos para evitar la congelación.

En los países de habla inglesa, donde predominan los panes a base de trigo, la masa madre no es el método estándar para el leudado pan. Éste fue gradualmente sustituido primero por el uso de levadura de fabricación de la cerveza, y a continuación, después de la confirmación de la teoría de los gérmenes por Louis Pasteur, por levaduras cultivadas. Aunque los panes de masa madre fueron arraigados en panaderías comerciales durante el siglo XX, se ha experimentado un renacimiento entre los panaderos artesanales.

La masa madre más famosa es la de San Francisco ya que su producción es continua desde el 1845 y cuyas masas se elaboran con masas pre-fermentadas de la época de la fiebre del oro de California. Se trata de un pan blanco que se caracteriza por una acidez pronunciada, tanto es así que la cepa dominante de lactobacilos en los 'estárteres' de la masa fue bautizada como *Lactobacillus Sanfranciscensis*. La producción industrial de pan blanco empezó a principios del siglo pasado, tras la introducción de levaduras como agentes para el leudado del pan que dejó atrás el uso de la masa madre o las levaduras cerveceras. Durante décadas, se han desarrollado muchos procesos para la elaboración de diferentes tipos de panes, cuyo objetivo común es convertir la harina de trigo en un conjunto de ingredientes ligeramente aireados y un producto final muy agradable al paladar. En las últimas décadas, el interés en el uso de la masa madre para la elaboración del pan ha incrementado considerablemente en diferentes países de la Unión Europea. Hoy en día, la mayor parte de consumidores prefiere alimentos saludables, con buen aroma y sabor, buena textura y una larga vida útil sin la adición de conservantes artificiales. La demanda de comida orgánica está también al alza, y una gran parte del pan elaborado con cereales orgánicos está elaborado con masa madre debido a su mayor calidad y mejor imagen. Cada vez más consumidores se interesan por los alimentos con historia y la masa madre está relacionada con la tradición y el origen del pan.

1.4.2 Tipos de masas madre o prefermentos

Las masas madre pueden iniciarse de las siguientes maneras:

a) Mediante la fermentación espontánea

Cuando una masa hecha con harina y agua se deja un o dos días a temperatura ambiente, se da lugar a una fermentación espontánea debido a la presencia natural de microorganismos en la harina. La masa acidifica fruto de la fermentación ácido láctica. Los recuentos de BAL en la masa pueden llegar a 3×10^9 unidades formadoras de colonias (cfu)/g y el número de levaduras entre 10^6 y 10^7 cfu/g. No obstante, la masa madre espontánea no siempre resulta exitosa y puede dar lugar a un producto sin sabor.

b) Añadiendo un trozo de masa madura (masa madre)

Las masas madre usadas por los artesanos panaderos y en las panaderías han sido tradicionalmente basadas en la fermentación espontánea cuya masa ha sido mantenida metabólicamente y microbiológicamente durante décadas gracias a la adición diaria de harina y agua, el llamado ‘refresco’. La masa madre fermentada se usa para la posterior elaboración del pan (Figura 4) pero una parte de ella es usada como cultivo iniciador de una nueva masa.

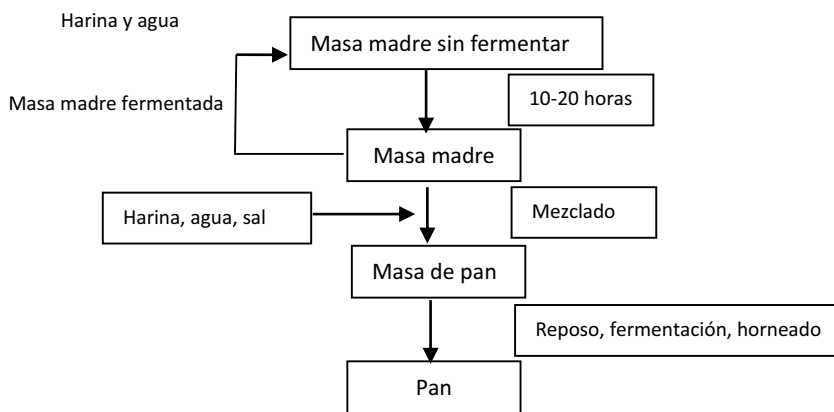


Figura 7. Esquema de la producción de masa madre.

c) Añadiendo un cultivo estéril

Los cultivos puros para la fermentación de masas madre son cultivos liofilizados de BAL o una mezcla de BAL y levaduras. Los microorganismos deben ser mezclados con harina y agua un tiempo suficiente para la fermentación de la masa y multiplicación de la microflora. La masa fermentada que resulte puede ser usada como masa madre. Los microorganismos habrán sido seleccionados en función de su habilidad para acidificar en un corto tiempo y por el perfil aromático que derive del pan final. En el mercado existen cultivos que contienen *Lactobacillus sanfrancinensis*, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. fructivoorans* o *L. brevis*, *L. pontis* y *Saccharomyces cerevisiae*. El uso definido de cultivos estéril con propiedades específicas da lugar a nuevas oportunidades interesantes de regular y controlar la fermentación de la masa madre.

1.4.3 Microbiología de las masas madre

La microflora de la masa madre está compuesta de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras adaptadas y con condiciones de crecimiento y poder fermentativo similares a las propias de la masa (temperatura, contenido de agua y pH) y que probablemente producen compuestos antimicrobianos. Las BAL son un grupo de bacterias Gram positivas, cocos o bacilos inmóviles anaeróbicos aerotolerantes o microaerófilos, acidófilos y tolerantes a la sal. Su fuente de energía deriva exclusivamente de la

fermentación de azúcares, de la que obtienen, ácido láctico como principal producto final. Estas bacterias son realmente útiles en la fabricación de alimentos fermentados o materias primas como frutas, vegetales, granos de cereal, carne y leche en los cuales contribuyen al sabor, la textura y la vida útil del producto. Además su importancia está evidenciada por su consideración de microorganismos generalmente seguros (*Generally Regarded As Safe*, GRAS, en inglés) debido a su presencia en gran variedad de alimentos y a que contribuyen como flora saprófita de las superficies mucosas humanas, favoreciendo la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, la reducción de colesterol en plasma y la modulación en el sistema immune (Tsai et al., 2008). Las fermentaciones de masa madre son generalmente llevadas a cabo bajo contacto limitado de aire. Los cereales con pH de 5-6,2, que son ricos en carbohidratos fermentables, serán preferentemente fermentados por BAL, al menos hasta un pH por debajo de 4. Valores por debajo de este punto, son las levaduras tolerantes a la acidez las que dominan la fermentación. Por tanto, fermentaciones espontáneas ricas en carbohidratos y ligeramente ácidas son normalmente caracterizadas por el crecimiento sucesivo o contemporáneo de BAL y levaduras. Las BAL son principalmente responsables de la acidificación de la masa madre mientras que las levaduras son muy importantes para la producción de compuestos aromáticos y para la obtención de un sabor armónico en el pan en combinación con los ácidos. Los niveles BAL en masas madre son de 10^8 - 10^9 cfu/g y los de levadura de 10^6 - 10^7 cfu/g. El ratio BAL:levadura es generalmente 100:1. Las BAL han sido taxonómicamente clasificadas en diferentes géneros según la morfología de la colonia, la fermentación de azúcares, el crecimiento a diferentes temperaturas, los tipos de ácidos producidos, la habilidad para crecer en concentraciones salinas altas, la tolerancia ácida o los análisis de la pared celular. Los géneros de BAL identificados en masas madre son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* y la mayoría de BAL en masas madre pertenecen al género *Lactobacillus*. Los lactobacilos se dividen en tres grupos en función de su patrón de fermentación de carbohidratos:

a) Homofermentativos obligados

Las hexosas son casi completamente fermentadas a ácido láctico (>85%) por la vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). La fructosa es también fermentada pero no lo son el gluconato ni las pentosas.

b) Heterofermentativo facultativo

Las hexosas son completamente fermentadas a ácido láctico por la vía EMP. Las pentosas son fermentadas a ácido láctico y ácido acético por una fosfocetolasa inducible.

c) Heterofermentativo obligado

Las hexosas son fermentadas a ácido acético, láctico, etanol y CO₂. Las pentosas se fermentan a ácido acético y láctico. Ambas vías, se llevan a cabo mediante la fosfocetolización.

La Tabla 7 muestra BAL homo- y heterofermentativas aisladas de masas madre espontáneamente fermentadas.

Tabla 7. BAL homo- y heterofermentativas encontradas en masas madre espontáneamente fermentadas.

BAL homofermentativas	BAL heterofermentativas
<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. plantarum</i>	
<i>P. acidilactici</i>	
<i>P. pentosaceus</i>	

BAL, bacterias ácido lácticas; *L.*, *Lactobacillus*, *P.*, *Pediococcus*. Adaptado de Stolz, P. (2003).

Por otro lado, se han aislado diferentes especies de levaduras de masas madres comerciales y artesanales. La sistematización e identificación tradicional ha estado siempre basada en pruebas bioquímicas así como en criterios morfológicos y fisiológicos. No obstante, los hongos imperfectos antiguamente llamados deuteromicetos o deuteromicotas de los que no se conoce la fase sexual de reproducción, no pueden ser estudiados con técnicas genéticas tradicionales. Las cepas de levaduras más frecuentemente encontradas en masas madre de centeno y trigo son *S. cerevisiae* (Tabla 8). Otras especies aisladas son *S. exiguus*, *Candida milleri* (*C. holmii*) y *C. krusei* (*Issatchenkia orientalis*). Las especies *Picchia Saitoi*, *P. norvengensis*, *Hansenula anomala* y algunas especies de *Saccharomyces* son encontradas con menos frecuencia en las masas madre.

Tabla 8. Levaduras aisladas de masas madre y sus sinónimos.

Levaduras	Formas asexuales	Sinónimos
<i>S. cerevisiae</i>		
<i>S. exiguus</i>	<i>Candida holmii</i>	<i>Torulopsis holmii</i> <i>Torula holmii</i> <i>S. rosei</i> <i>Torulopsis holmii</i>
<i>S. delbrueckii</i>	<i>Candida milleri</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>S. uvarum</i>		<i>S. inusitatus</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>S. krusei</i> <i>Endomyces krusei</i>
<i>Pichia anomala</i>	<i>C. peliculosa</i>	<i>Hansenula anomala</i>
<i>P. membrifaciens</i>	<i>C. valida</i>	
<i>P. norvegensis</i>		
<i>P. polymorpha</i>		
<i>P. satoi</i>		
<i>Endomycopsis fibuligera</i>		<i>S. fibuliger</i>

C., *Candida*; *S.*, *Saccharomyces*; *P.*, *Pichia*. Adaptado de Stolz, P. (2003).

1.4.4 Fenómenos bioquímicos

La fermentación de las masas madres tiene diferentes funciones y efectos bioquímicos en el producto final (pan). La harina es el sustrato básico para la fermentación de los microorganismos. La harina de trigo y la de centeno son las más comúnmente usadas aunque de la harina de maíz también se hace uso. La cantidad de carbohidratos fermentables en la harina depende del tipo de cereal pero en particular de la actividad endógena enzimática en la harina. Las actividades de las amilasas, las xilanasas y peptidasas son importantes en la liberación de carbohidratos de bajo peso molecular y aminoácidos. En la masa fermentada, la α -amilasa no puede degradar los gránulos de almidón intactos, pero algunos gránulos son dañados durante el proceso de molienda y pueden encontrarse parcialmente degradados en la masa. Generalmente las BAL no degradan el almidón, y el contenido de mono y disacáridos fermentables en harina de centeno es de alrededor del 5% siendo la maltosa (3%) la predominante. El contenido de pentosanos (arabinosilanos) en la harina de centeno es alto (6,5% a 12,2%) comparado con la harina de trigo (2-3%) y pueden ser degradados a pentosa xilosa y arabinosa mediante los correspondientes enzimas durante el proceso de elaboración del pan. El contenido de carbohidratos fermentables en la

harina de trigo es del 1-2% y el contenido de maltosa incrementa durante la fermentación de la masa madre de 1,5% a 2,4%.

El aroma en la miga del pan depende principalmente del tipo de harina y de las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la fermentación en la masa madre, mientras que el aroma de la corteza del pan está más influenciada por las reacciones térmicas durante el proceso de horneado (Reacciones de Maillard). La inclusión de masa madre en la elaboración del pan incrementa las características aromáticas del pan. El contenido en compuestos volátiles en el proceso de elaboración de las masas madre depende del tipo de harina (trigo, centeno o maíz), la tasa de extracción de la harina, la temperatura de fermentación, la actividad de agua y los microorganismos de la masa. Generalmente, las BAL de la masa madre son responsables de la acidificación de la masa, mientras que las levaduras lo son para la producción de compuestos aromáticos. La tasa de extracción de la harina y el contenido de agua afecta en la acidificación de la masa. A mayor tasa de extracción, mayor es la producción de ácido acético y láctico. Mayores contenidos de agua y mayor temperatura de fermentación conllevan mayor propagación de levaduras y mayor contenido de isoalcoholes. La Tabla 9 recoge los principales compuestos aromáticos volátiles y no volátiles encontrados en masa madre de trigo (Rhemana et al., 2006).

Tabla 9. *Compuestos aromáticos volátiles y no volátiles presentes en masa madre de harina de trigo.*

Acetato de etilo	3-Metil-1-butanol	1-Heptanol	Hexanal	Benzaldehído
Ácido láctico	2-Metil-1-butanol	Heptano	3-Metil-hexanal	Diacetilo
Ácido acético	1-Pentanol	1-Octanol	Heptanal	
Etanol	2-Metil-1-pentanol	Acetaldehído	Trans-2-heptenal	
1-Propanol	1-Hexanol	3-Metil-1-butanol	Octanal	
2-Methyl-1-propanol	3-Hexen-1-ol	2-Metil-1-butanol	Nonanal	

Por otro lado, la alta estabilidad de la vida útil de las masas madres es debido a la producción de compuestos inhibitorios pero, además, es importante la interacción de BAL y levaduras en la matriz panaria. Varias especies de bacterias lácticas en masas madre producen sustancias inhibitorias contra microorganismos nocivos. Estos compuestos son ácidos orgánicos en particular el ácido acético, el etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y diacetilo. No obstante, la inhibición también puede ser debida a la producción de bacteriocinas, que son moléculas de péptidos o proteínas de bajo peso molecular con un efecto bactericida potente, sobre todo contra especies microbianas filogenéticamente cercanas. Los efectos bioquímicos más importantes en la fermentación de masa madre se resumen en la Tabla 10.

Finalmente, es importante destacar la posible producción de aminas biógenas (AB) en las masas madre. Las AB son bases orgánicas de bajo peso molecular que se forman y degradan como resultado de la

actividad metabólica en animales, plantas y microorganismos. Un factor esencial en la formación de AB en masas madre es la capacidad que tienen las BAL de descarboxilar aminoácidos, por ejemplo, la histamina se forma a partir de la histidina, la tiramina de la tirosina, la triptamina del triptófano y la feniletilamina de la fenilalanina. Pese a que esta habilidad ha sido descrita en diferentes géneros bacterianos, los principales productores de AB son las BAL (Arena & Manca de Nadra, 2001). La ingesta de alimentos con altos contenidos en AB puede derivar en importantes problemas toxicológicos y provocar reacciones adversas como migraña, hipertensión, náuseas y sarpullidos en la piel, entre otros. Las AB más comunes en alimentos son la histamina, la putrescina y la cadaverina. En conclusión, las masas madre son un medio propicio para la generación de AB ya que existe disponibilidad de sustratos de aminoácidos libres y las condiciones son favorables para la actividad de descarboxilación. Algunas de estas condiciones son el nivel de proteólisis, el pH, el uso de estérteres y enzimas y la duración y temperatura de fermentación.

Tabla 10. *Funciones generales de la masa madre para panes de trigo y centeno.*

Incremento del valor aromático por:

- Precusores de aroma y sustancias aromáticas como péptidos, aminoácidos, azúcares reductores, lactato, ácido acético, etanol, otros alcoholes, ésteres, carbonilos, etc.
- Actividad antimicrobiana por la bajada de pH y el ácido acético
- Inhibición de moho
- Inhibición de microorganismos causantes del deterioro y podredumbre

Incremento de las características reológicas de la masa por:

- Mayor capacidad de retención de agua
- Aumento de la elasticidad

Incremento de la vida útil del producto por:

- Retraso de la retrodegradación
 - Aumento del mantenimiento del frescor
 - Mejora de textura en la corteza
 - Mejora el color
 - Reacciones de Maillard
-

2. Hypothesis and objectives of the thesis

The objective of this thesis was to develop a naturally sourdough bread enriched primarily in GABA and also ACE-inhibitor peptides that could help to regulate blood pressure after its consumption.

The general hypothesis of this thesis is that the consumption of bread enriched in GABA and with a reduced sodium chloride content could have a short- and medium-term hypotensive effect compared to traditional bread or low-salt bread.

The specific objectives that stem from this hypothesis are detailed below.

1. To isolate and patent lactic acid strains with high proteolytic activity that allow us to obtain dough containing naturally occurring lactobacilli and yeasts rich in GABA and ACE-inhibitors.
2. To study controlled fermentation with several different strains of lactic acid bacteria and different substrates in order to produce biologically active molecules, primarily GABA and also ACE-inhibitors.
3. To study the replacement of sodium (Na) by potassium (K) in a physiologically significant proportion (with an objective of a minimum of 50%) while minimising the organoleptic drawbacks that this change in the formula involves through the use of dough containing naturally occurring lactobacilli and yeasts.
4. To test and validate the production process and suitability of the bread obtained in tests performed in a pilot plant compared to other types of bread on the market.

3. Diseño experimental y metodología

Las materias primas y los procedimientos experimentales se detallan en las publicaciones originales I-VI. A continuación se presenta sólo un breve resumen.

3.1 Muestras y diseño experimental

Se recolectaron alrededor de 65 quesos artesanales españoles, de diferente tipo de curación (fresco, semi-curado, curado) y origen de leche (vaca, cabra, oveja, mixta), de todo el territorio español con un porcentaje mayoritario en Cataluña. Los quesos fueron usados en los estudios I y II, para el *screening* y aislamiento de bacterias ácido lácticas y para el análisis del perfil aminoacídico, respectivamente. Los panes analizados para el estudio III fueron comprados en supermercados y panaderías artesanales de la provincia de Barcelona. A continuación se detalla la receta que se usó para la elaboración del pan experimental (Tabla 11).

Tabla 11. *Receta de ingredientes en la elaboración del pan experimental con masa madre rica en GABA.*

Componentes de la masa	Kg	% sobre harina	% sobre el total
Harina de trigo	50	100	60,09
Agua	14	28	16,82
Sal sólida	0,65	1,3	0,78
Levadura granulada	0,75	1,5	0,90
Mejorante panario	0,2	1,4	0,24
Citrato de Potasio	0,11	0,22	0,13
Masa madre experimental	17,5	35	21,03

3.2 Microorganismos y análisis microbiológicos

Las BAL y levaduras utilizadas en las masas madre y la elaboración del pan quedan esquematizadas en la Tabla 12. La cepa bacteriana usada como control también está incluida (*L. brevis* NBRC 12005). Las cepas registradas en el Centro Español de Cultivos Tipo (CECT) fueron patentadas (PCT/ES2013/070652).

Tabla 12. Cepas microbianas usadas en los estudios.

Cepa microbiana	Origen/Proveedor	Publicación
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT 8181	Queso curado de oveja	I,V
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT 8182	Queso curado de cabra	I,V
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT 8183	Queso curado de cabra	I,III,V
<i>Lactococcus lactis</i> CECT 8184	Queso curado de cabra	I,V
<i>Lactobacillus brevis</i> NBRC 12005	NITE Biological Resource Center (NBRC) National Institute of Technology and Evaluation (NITE) (Chiba, Japón)	I,III,V
Levadura comercial	Lasaffre Ibérica, S.A (Valladolid, España)	III

3.2.1 Screening de Bacterias Ácido Lácticas y análisis cualitativo de GABA

En el estudio I se realizó un *screening* para bacterias ácido lácticas de más de 65 quesos preferentemente artesanales que representaban los diferentes tipos y marcas del mercado español.

Para el aislamiento y crecimiento de las cepas, se preparó una dilución 1/10 de la muestra en agua de peptona. La suspensión fue homogeneizada mediante el homogeneizador *stomacher* (UIL Instruments HO001) y se realizaron 3 diluciones decimales de cada muestra. Un mililitro de una de las diluciones fue sembrado en una placa de petri estéril a la que se añadió 15 ml de MRS agar y se dejó enfriar. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 30°C en condiciones de anaerobiosis (BD GasPak Ez Container Systems).

Tras 48h de incubación se tomaron un mínimo de 10 colonias aisladas de cada producto y a continuación se evaluó la actividad GAD de cada una de ellas mediante el Método del Indicador de pH (PIM) (Yang et al., 2006). El Indicador de pH se preparó mezclando en 1:1 (v/v) rojo de metilo (0,2%) y metileno de azul (0,1%) en etanol. A pH<5.4 el indicador es de color magenta mientras que a pH>5.4 el color es verde. Una vez obtenido crecimiento en MRS a 30°C, los tubos fueron centrifugados a 5.000 g durante 15 min, los pellets se lavaron tres veces en una solución de NaCl al 0,85% y se resuspendieron en 10 veces (p/v) en una solución de L-glutamato monosódico (10 mM que contenía 0,1 mM de Tween 80) ajustada a un pH de 4,7. Los tubos se dejaron incubar a 37°C durante 1 a 4 días en los que el

sobrenadante era analizado cualitativamente a diario con el indicador. Tras la adición de unas gotas del complejo la cepa mostraba actividad GAD si el color cambiaba de magenta a verde.

Como población control para los ensayos se tomó la cepa contrastada *Lactobacillus brevis* NBRC 12005 (Ueno et al., 1997) procedente de la *Biological Resource Center* (NITE) de Japón conocida por su alta actividad de la enzima GAD, con la que se estableció la concentración óptima de L-glutamato para obtener el mayor rendimiento de conversión a GABA. Tras las pruebas con diversas concentraciones (entre 0,01 y 0,5 mM) y dos temperaturas de incubación (30 y 37 °C) se observó que 0,01 mM y 37°C eran las condiciones ideales para la realización de este experimento pese a que la biomasa bacteriana crecía indistintamente a ambas temperaturas.

Tras comprobar la actividad GAD de las 10 colonias de BAL aisladas de cada producto se obtuvieron un total de 12 cepas que fueron identificadas y conservadas en criobolas a -80°C.

3.2.2 Caracterización fenotípica

Para la identificación fenotípica del perfil fermentativo de las cepas se usaron las galerías API 50CHL o Índice de Perfil Analítico (Biomérieux, Francia). Cada colonia aislada se suspendió e inoculó en cada pocillo de la galería. Durante la incubación (48h a 30°C), el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. Estos patrones fermentativos permitieron la identificación del microorganismo con la ayuda del Software informático de identificación API web.

3.2.3 Caracterización genotípica

A fin de asegurar los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica se procedió a secuenciar el ADN ribosómico 16S de las cepas a fin de esclarecer su identificación. Para ello se extrajo el ADN bacteriano empleando un método automatizado basado en el uso de sílica magnética y se midió su concentración y pureza espectrofotométricamente. A continuación se realizó la amplificación mediante PCR del ADNr 16S con el uso de marcadores universales en un termociclador (7300PCR System de *Applied Biosystems*). Posteriormente se verificó el amplificado en gel de agarosa y se purificó con el uso de kits comerciales. Finalmente se secuenció el fragmento de amplificación y se procedió a su análisis e identificación por comparación con bases de datos universales (NCBI).

3.3 Análisis cuantitativo de GABA y otros aminoácidos

a) en la masa madre (I, III y apartado 3.7)

La extracción de GABA y otros aminoácidos libres de las masas madre se realizó centrifugando a 20.000 g durante 15 min a 4°C. Tras filtrar una alícuota del sobrenadante, se realizó una derivatización en precolumna mediante la metodología del reactivo 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinil carbamato (AccQTag) de Waters para poder cuantificar a través del detector de absorción ultravioleta en cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (CLAE-FR). Para derivatizar, 10 µl de muestra se mezclaron con 70 µl de tampón borato Acc Q fluor (Waters) que tras homogeneizar en vórtex unos segundos se le añadió 10 µl del reactivo reconstituido AccQ fluor. La mezcla fue nuevamente

homogeneizada y tras un minuto de reposo a temperatura ambiente, se calentó 10 min en un bloque calentador a 55°C para finalmente añadir 100 µl del diluyente cromatográfico A e inyectar en el cromatógrafo de gradiente modelo Waters 600 consistente en un módulo controlador, una bomba Waters Delta 600 y un inyector automático (Waters 717 plus). La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante una columna C18 AccQTag de Waters (4 µm, 3,9 x 150 mm) que estuvo mantenida en un horno a temperatura constante (37°C). El volumen de inyección fue de 10 µl. La fase móvil A consistió en un eluente de AccQ.Tag (100 ml de AccQ.Tag concentrado + 1L de agua milli-Q). Las fases B y C fueron acetonitrilo (grado CLAE) y agua mili-Q, respectivamente. El mejor gradiente de separación fue el siguiente: tiempo=0 min, A:B:C (100:0:0); tiempo= 0.5 min, A:B:C (100:0:0); tiempo=18 min, A:B:C (95:5:0); tiempo=19 min, A:B:C (91:9:0); tiempo=29.5 min, A:B:C (83:17:0), tiempo=38 min, A:B:C (0:60:40); tiempo=41 min, A:B:C (100:0:0). Posteriormente se usó la detección por absorbancia UV (detector Waters 2487 UV) para determinar los aminoácidos derivatizados.

b) en los panes (III)

La extracción se realizó mediante una agitación mecánica de 1,5 g de pan con 10 ml ácido clorhídrico 0,1 M que contenía 2,5 M de Norleucina como patrón interno. La muestra se centrifugó a 20.000 g y 4°C durante 10 min y el sobrenadante se filtró mediante filtros de 0,45 µm.

El método cromatográfico fue el mismo que para las masas madre.

c) en los quesos (II)

Los aminoácidos en quesos se extrajeron mediante hidrólisis ácida. Para la desproteneización, la muestra fue centrifugada y mezclada con un volumen conocido de ácido tricloroacético (400 g/L). Posteriormente se mantuvo 10 minutos en un baño de hielo y posteriormente se centrifugó. El sobrenadante se filtró y evaporó en su totalidad en un concentrador (SpeedVac Plus AR SC110). Una vez evaporada, se resuspendió en 500 µl de tampón borato y el pH de la solución se llevó a 8,5 antes de derivatizar. El procedimiento derivativo y las condiciones cromatográficas fueron las mismas que para masas madre y panes.

3.4 Análisis de aminas biógenas (III)

Las aminas biógenas fueron determinadas por una primera extracción con ácido tricloroacético al 10% seguido de un ajuste de pH para la posterior derivatización con orto-ftaldehído (OPA). La cuantificación se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia y detección por fluorescencia. El interés en el análisis de aminas biógenas vino de la capacidad microbiana de producir estos metabolitos muchos de los cuales son tóxicos (por ejemplo, la histamina o la tiramina).

3.5 Análisis de acrilamida (III)

La acrilamida es un compuesto orgánico de tipo amida que se forma debido a las reacciones de Maillard que se dan durante el horneado del pan. Está clasificada como compuesto ‘probablemente cancerígenos para los humanos’ (IARC 2). El contenido de acrilamida se analizó mediante la metodología propuesta por Waters (*Acrylamide analysis using LC/MS/MS. Application Overview. PosterREPRINT. Waters Corporation 2002*) y detectado por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (CL-EMT). Se usó un analizador de masa de triple cuadrupolo para aumentar la sensibilidad y especificidad del método.

3.6 Análisis de la actividad IECA (VI)

Este trabajo fue realizado en el marco de un contrato de apoyo tecnológico entre la agencia estatal del Consejo Superior de Investigación Científicas y Europastry. El objetivo del contrato fue conocer la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) en la fracción peptídica de: 1) la masa madre experimental (con intensa proteólisis y rica en GABA); 2) el pan experimental elaborado con dicha masa madre; 3) un pan bajo en sodio y 4) un pan convencional (control).

En primer lugar se procedió a la obtención de la fracción peptídica menor de 3.000 Daltons ya que, diversos estudios han puesto de manifiesto que los péptidos derivados de proteínas alimentarias con actividad IECA tienen una secuencia de 2 a 20 aminoácidos y un tamaño menor a 3.000 Da (Guang & Phillips, 2009). Para ello, se determinó el contenido de péptidos en la fracción soluble de la masa madre y de los distintos panes mediante ultrafiltración a través de una membrana de 3.000 Da de tamaño de corte y los permeados fueron concentrados mediante liofilización. Para la evaluación de la actividad IECA de las fracciones peptídicas obtenidas se utilizó el método descrito por Sentandreu y Toldrà (2006). Para este ensayo, se prepararon distintas soluciones de muestra en tampón fosfato 0,1 M pH 8 con distinta concentración de péptidos. Estas soluciones se dispensaron en placas multipocillo para fluorescencia en las que se añadió un control negativo (tampón fosfato) y un control positivo (Captopril). A continuación, se añadieron 50 µL de solución ECA de pulmón de conejo en tampón Tris-base 150 mM pH 8,3. La placa fue preincubada (10 min 37°C) antes de dispensar automáticamente 200 µL de una solución tripéptido en el mismo tampón Tris-base. La lectura de fluorescencia se realizó en un lector de placas multipocillo (Biotek Instruments) mediante el uso de filtros con longitud de onda de excitación y emisión de 355-375 nm y 400-430 nm, respectivamente. La actividad IECA se calculó como % de la inhibición de la actividad ECA mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - (\Delta\text{RFU}_{\text{(muestra o captopril)}} / \Delta\text{RFU}_{\text{(control negativo)}})$$

Donde, ΔRFU es el incremento de unidades de fluorescencia relativas de los tiempo 0 min hasta los 30 min de reacción.

Además, la concentración de péptidos necesaria para inhibir el 50% de la ECA (IC_{50}) se determinó realizando un análisis de regresión ajustando los puntos a una curva sigmoideal dosis-respuesta mediante el software GraphPad Prism 4.0.

3.7 Análisis comparativo de cepas *Lactobacillus*

Este estudio conforma los tres meses de estancia en Bélgica durante la tesis. El proyecto de investigación se llevó a cabo en un centro de investigación del Grupo Puratos (Andenne, Bélgica), en el Departamento de I+D, especializado en conocimientos de masas madre. El trabajo consistió en realizar un amplio estudio comparativo entre la cepa patentada por Europastry, S.A, *Lactobacillus brevis* CECT 8183, y dos cepas más proporcionadas y patentadas por Puratos. A pesar de que se obtuvieron interesantes resultados, no existe ninguna publicación asociada a esta tesis por motivos de confidencialidad por parte de la empresa Belga. No obstante, a continuación se resume el procedimiento que se siguió. Los factores comparativos del comportamiento entre las cepas *L. brevis* CECT 8183 y *L. brevis* Puratos Group y *L. plantarum* Puratos Group incluyeron:

1) La actividad GAD de las cepas, mediante el método del *screening* puesto a punto en la presente tesis.

2) La producción de GABA en fermentaciones clásicas

La formulación de las fermentaciones clásicas que se llevaron a cabo consistían en un 30:60 de harina:agua, con un 10% de una solución acuosa compuesta de 1 g de la cepa pura, 1,2g de sal y 1,3g de fructosa. Estas fermentaciones se realizaron para cada una de las 3 cepas y por triplicado. Se registraron la producción de GABA, la acidez, la acidez total titulable (TTA) y la materia seca a las 48h de incubación a 30°C.

3) La producción de GABA en una fermentación optimizada en bioreactor de 15L

Se ensayaron las dos cepas con alta actividad GAD (*L. brevis* CECT 8183 y *L. brevis* Puratos Group) en una fermentación optimizada para la producción de GABA en un bioreactor con capacidad de 15L (Figura 5).



Figura 8. Bioreactor (Biostat C-DCU, Sartorius, Germany) usado para la fermentación optimizada de GABA.

Los ingredientes usados y los parámetros establecidos fueron los mismos que se detallan en la publicación III. Transcurridas las 72h de fermentación, se analizaron las concentraciones de GABA alcanzadas para cada cepa. La fermentación optimizada sin el control del pH (4,5) también se probó en esta escala ya que, el pH no puede ser controlado en los biorreactores industriales (80 L). Para esto, las mismas condiciones en masas madre para la producción de GABA se llevaron a cabo en 15L de fermentación pero sólo se puso a prueba la cepa *Lactobacillus brevis* CECT 8183. La concentración de GABA se determinó hasta las 48h de fermentación ya que no se preveía alargar el tiempo a escala mayor.

4) La producción de GABA en una fermentación optimizada en bioreactor de 80L

El objetivo de ascender en los volúmenes de las fermentaciones residió en conseguir llegar a una escala cercana a la industrial, para poner de manifiesto la posibilidad de producir una masa madre rica en GABA y su posible comercialización, siguiendo las expectativas de cualquier empresa alimentaria.

Para ello, se siguió la misma metodología que para escalas inferiores pero con la dificultad añadida se conseguir el volumen necesario de cultivo puro (estárter) inicial, en este caso un 10% del volumen total. Por tanto, con el fin de garantizar un mínimo de 10^8 ufc/ml en 80L de fermentación de masa madre, se realizaron tres pasos a escala laboratorio. Una vez que se obtuvo crecimiento a partir de dos criobólas en tubos con caldo MRS a 30°C durante 48h de incubación, 5 ml del medio, previamente homogeneizado, fue transferido a un matraz Erlenmeyer de 500 ml con MRS caldo, que se incubó a 30°C. Al cabo de 24h, se transfirieron 200 ml del matraz a otro de 2 L conteniendo también caldo MRS.

El mismo paso se llevó a cabo con 800 ml de medio a 8 L de caldo MRS en el bioreactor Biostat C-DCU (Figura 5), que fue, previamente, esterilizado *in situ*. Un día después de incubar a 30°C, el sedimento se centrifugó, se lavó y se recogió en agua fisiológica (NaCl al 0,9%). Se midió la densidad óptica (DO) para asegurar la concentración celular deseada. Se procedió a mezclar el estárter obtenido con el resto de ingredientes y dejar fermentar durante 48h a 30°C. El análisis de GABA se efectuó según se explica en el apartado 3.3.

3.8 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante procedimientos estadísticos estándares tal y como se describe en las publicaciones individuales (II, III). En el estudio II, se aplicó un test de verisimilitudes ajustado a un modelo de regresión lineal considerando la leche y el tipo de maduración como principales factores. La comparación de medias entre diferentes subgrupos se hizo mediante análisis post-hoc. Para todos los casos, se consideraron los valores de $p < 0,05$ como significantes. También se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para el conjunto de aminoácidos libres presentes en los quesos y las BAL mediante una matriz de correlación. En el estudio de los panes (III) se utilizó el T-test convencional o el T-test corregido (cuando no se podía asumir variancias iguales) o en caso de no normalidad se usó el test no paramétrico de Wilcoxon. Para las variables cuantitativas se usó el test Ji-cuadrado o en caso de no cumplirse condiciones de aplicación se usó el test exacto de Fisher. Todas las evaluaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Para el estudio de la actividad IECA, los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) y comparados estadísticamente con un nivel de probabilidad de 95% usando el test de Tukey HSD (Statgraphics Centurion XVI).

4. Artículos publicados

4.1 *Spanish Cheese Screening and Selection of Lactic Acid Bacteria with High Gamma Aminobutyric Acid Production*

Marina Diana, Alba Tres, Joan Quílez, Marta Llombart & Magdalena Rafecas
LWT, Food Science and Technology (2014), 56, 351-355

Índice de impacto (2014): 2,468

Categoría: Food Science and Technology, 26 de 123 (1er cuartil)

Resumen:

El objetivo de este estudio fue el de evaluar la capacidad productora de GABA en masa madre de bacterias ácido lácticas que habían sido previamente aisladas de quesos artesanales Españoles y que mostraron una alta conversión de ácido glutámico a GABA en los ensayos cualitativos previos. La síntesis de GABA en una solución no optimizada de harina de trigo integral y agua (1:5) fue cuantificada mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. Las 4 cepas que mostraron mayor producción de GABA fueron fenotípica y genotípicamente caracterizadas mostrando una interesante variabilidad fermentativa entre especies. La adición de estas cepas en productos alimenticios fermentables podría asegurar un potencial uso funcional para regular la tensión arterial.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

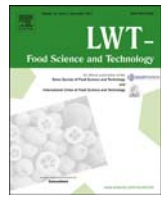
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production



Marina Diana ^{a,b,*}, Alba Tres ^a, Joan Quílez ^{b,c,d}, Marta Llombart ^b, Magdalena Rafecas ^a

^a Nutrition and Food Science Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Technology Department, Europastry, S.A., Spain

^c Human Nutrition Unit, School of Medicine, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

^d CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2013

Received in revised form

14 October 2013

Accepted 23 November 2013

Keywords:

Gamma-aminobutyric acid

Lactic acid bacteria

Functional food

Sourdough

Hypertension

ABSTRACT

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-protein four-carbon amino acid which is considered a bioactive component known for its physiological functions, including a regulator of blood pressure, neurotransmitter, diuretic and anti-stress effects. Its use in foods might confer health benefits. Microorganisms such as yeast, fungi or bacteria can produce GABA naturally. Among them, the lactic acid bacteria are being studied for the potential development of fermented foods because their physiological activities and their designation of generally recognized as safe (GRAS). The objective of this study was to evaluate the GABA-production capacity in a whole wheat flour medium of lactic acid bacteria strains that showed a high conversion of glutamic acid to GABA in a screening conducted in 58 Spanish artisanal cheeses. Synthesis of GABA by these strains in a non-optimized whole wheat flour in water solution (1:5) was quantified by High-Performance Liquid Chromatography. The 4 strains showing the highest GABA production were genotypically and phenotypically characterized. Results indicated an interesting fermentative variability between strains. The addition of these isolated lactic acid strains in fermented food products could allow a potentially functional food for regulating hypertension.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hypertension is a major cause of cardiovascular disease, ranking first in hospitalization and even death in many developed countries (Kannel, Ho, & Thom, 1994). One of the most important causes of hypertension is high salt intake. Currently, diets attempt to include less salt in their compositions; however salt reduction involves a decrease in the intensity of the product flavour. The inclusion of bioactive molecules able to reduce hypertension is a novel approach in functional food research. At present, one of the most frequently studied families is bioactive peptides from fermented dairy products. These peptides have inhibitory action on the angiotensin-converting enzyme (ACE), which prevents the formation of angiotensin II, a potent vasoconstrictor. Clinical evidence has shown that they decrease blood pressure (Ricci, Artacho, & Olalla, 2010). Another functionally active molecule with high

development potential is gamma-aminobutyric acid (GABA). This amino acid acts as an inhibitor type of neurotransmitter in the brain, binding to specific receptors on the plasma membranes in neuronal processes. The GABA-induced antihypertensive effect seems to be due to its inhibition of noradrenaline release through an action on presynaptic GABA receptors, and thus suppressing the increase in perfusion pressure (Hayakawa, Kimura, & Kamata, 2002). GABA production is caused by the irreversible decarboxylation of L-glutamate by the action of the enzyme, glutamic acid decarboxylase (GAD), which is dependent on the pyridoxal 5'-phosphate molecule or vitamin B₆. Numerous studies have demonstrated the presence of GAD in some lactic acid bacteria and the resistance of GABA under acidic conditions (Cotter & Hill, 2003). GABA has demonstrated its ability to induce hypotension in animal models (Hayakawa et al., 2004), as well as in human intervention trials (Inoue et al., 2003). GABA has also shown diuretic and tranquilizer effects (Guin Ting Wong, Bottiglieri, & Carter Snead, 2003) and has been beneficial in alcoholism treatment (Oh, Soh, & Cha, 2003), depression (Okada et al., 2000) and stimulation of immune cells (Oh & Oh, 2003). In one of the few studies in Europe of this compound, some lactic acid bacteria (LAB) (*Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis*) isolated from cheese showed high

* Corresponding author. Nutrition and Food Science Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4024508; fax: +34 93 4035931.

E-mail addresses: marinadiana@ub.edu, marinadiana28@gmail.com (M. Diana).

Table 1
Origin of isolated strains, pH variation on the screening experiment and GABA concentration after 24 h fermentation in a 20% wheat flour dissolution.

Strain	Specie	Source	Initial pH	Final pH	GABA concentration ^c (mM)	Log CFU/ml at 0 h	Log CFU/ml at 24 h
Control	<i>L. brevis</i> 12005	NITE ^a	4.7	6.8	0.83 ± 0.05	10.38	10.81
C	<i>L. brevis</i> CECT 8183	Goat cheese	4.7	6.8	0.96 ± 0.07	8.97	10.88
B	<i>L. brevis</i> CECT 8181	Sheep cheese	4.7	7.1	0.94 ± 0.08	9.96	10.43
D	<i>L. brevis</i> CECT 8182	Goat cheese	4.7	6.3	0.99 ± 0.01	10.51	10.96
A	<i>Lactococcus lactis</i> CECT 8184	Goat cheese	4.7	6.8	0.93 ± 0.003	9.60	10.92
Blank ^b					0.58 ± 0.06	2.30	9.80

^a National Institute of Technology and Evaluation (Japan).

^b Blank is the fermentation experiment of the 20% wheat flour dissolution without any *Lactobacillus* strain added.

^c Data are means of triplicate determination ± SD.

GABA synthesis (Siragusa et al., 2007). These strains have been added to sourdough for development of new bakery products (Rizzello, Cassone, Di Cagno, & Gobbetti, 2008).

Artisan Spanish cheese is the basic fermented product in Spanish culture and diet and constitutes a good source of high quantity and variability of lactic acid bacteria with high proteolytic capacity. The aim of this study was to isolate high GABA-producing *Lactobacillus* strains from a wide variety of artisan Spanish cheeses and to select those that also showed the highest GABA-production capacity in wheat flour medium. The importance of this work includes the possibility of making natural fermentation substrates, which increase its physiological value. This fermentation offers the possibility of creating a potentially low-cost functional bakery food for human consumption. Screening of LAB strains with high GABA-producing ability could be of interest for food fermented and pharmaceutical industry in order to obtain probiotic products and exploit the functional properties of GABA.

2. Materials and methods

The study design was divided into (i) a cheese screening test to select the highest GABA-producing bacteria; (ii) evaluation of the GABA-producing capacity of these selected strains in a sourdough medium; and (iii) characterization of finally selected strains.

2.1. Screening test

A total of 58 commercial cheeses were purchased at Spanish local markets and farms. The types of cheese analyzed for the screening of lactic acid bacteria were: fresh, half-ripened, ripened and old-ripened cheeses from goat, cow, sheep or mixed milks. Torte-style, flavoured and spicy cheeses were also analyzed. Samples were stored in the dark at 4 °C before analysis.

For the isolation and growth of the strains, 10 g of cheese were mixed with 90 ml of peptone water (AES Chemunex, Terrassa, Spain). The suspension was homogenized in a stomacher (UIL Instruments HO001, Barcelona, Spain) and 3-fold dilutions were made of each sample. One millilitre of the dilutions was seeded in a sterile petri plate, to which 15 ml of Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar had previously been added, and allowed to cool. Subsequently, the plates were incubated at 30 °C under anaerobic conditions (BD GasPak Ez Container Systems, Sparks, Maryland, USA). After 48 h incubation, a minimum of 10 colonies with different morphology were isolated from each product and resuspended in MRS broth tubes. GAD activity was assessed for each one, using the pH indicator method (PIM) (Yang et al., 2006). *Lactobacillus brevis* NBRC 12005 (Ueno, Hayakawa, Takahashi, & Oda, 1997), known for its high GAD enzyme activity, was taken as a control population and was acquired by the Biological Resource Centre (NITE) of Japan.

From all colonies tested (10 × 58 cheeses), the ones qualitatively showing GAD activity similar to the control strain were selected and used in further steps. They were preserved in the form of pure culture cryobeads at –80 °C.

2.2. GABA production in a sourdough medium

2.2.1. Culture medium and conditions

The capacity of GABA production in a non-optimized wheat flour solution (simulating a sourdough medium) was quantitatively assessed for the selected strains. The bacterial biomass was recovered by growing cryobeads in tubes with MRS for 48 h at 30 °C. Following growth, tubes were centrifuged and the pellet washed and mixed with Ringer ¼ (AES Chemunex, Terrassa, Spain). The suspension obtained from each of these strains was inoculated in the sourdough medium, consisting of 20% wheat flour and 80% distilled water in a 500 ml Erlenmeyer flask under sterile conditions. Flasks were stirred every 3 h. After 24 h incubation at 30 °C, GABA concentration was determined and the pH monitored. The analysis was performed in triplicate, comparing both blank (20% wheat flour and 80% water without inoculation) and the same medium containing the control strain.

2.2.2. GABA determination

For the GABA extraction, an aliquot of the wheat flour dough medium was centrifuged at 20,000 g for 15 min at 4 °C. GABA was quantified by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, followed by UV detection after precolumn derivatization by the reagent methodology, 6-aminoquinolyl-N-hydroxy succinyl carbamate (AccQTag) (Cohen & Michaud, 1993).

2.2.3. Bacterial count

The number of CFU per ml was evaluated at the beginning and end of the inoculated wheat flour dough incubation. For this, an aliquot of 1 ml of the medium was extracted from the flasks and different dilutions were made in peptone water. 1 ml of each dilution was grown in a sterile petri plate to which 15 ml of MRS agar had been added. After cooling, the plates were incubated at 30 °C in anaerobic conditions (BD GasPak Ez Container Systems, Sparks, Maryland, USA).

2.3. Strain characterization

The strains exceeding the performance of the control strain in the synthesis of GABA under the culture conditions proposed were characterized phenotypically and genotypically. The phenotypic identification of the ten strains was based on the fermentation system, API Gallery 50 CHL (BioMérieux, SA, France). The API test strips were prepared as recommended by the kit supplier and

scored after incubation for 48 h at 30 °C. Every isolated colony was suspended and seeded in each well of the gallery. These fermentation patterns allowed the characterization of the microorganisms with the software identification WEB API, which uses the phenotypic data to predict a species identity for each isolate.

To ensure the results of the phenotypic characterization, the 16S rRNA of the strains was fully sequenced (Hall, Doerr, Wohlfiel, & Glenn, 2003), analyzed and identified by comparison with universal databases (NCBI).

3. Results

3.1. Cheese strains with GAD activity

The GAD activity of 580 colonies (10 colonies per cheese) was qualitatively assessed. Changes in colour from magenta to green observed in L-glutamate medium due to pH values above 5.4 allowed strains with high or low GAD activity to be distinguished. Rapid changes (24 h or less) showed high GAD activity, since slow (48 h or more) or diffuse (grey) change in colour means low activity. If more than 72 h was required to distinguish colour, the strain was discarded. Results showed that a total of 65 colonies belonging to 23 cheeses resulted positive in the screening test, which represents 11.2% of the total colonies analyzed. A total of 10 colonies out of these 65 (Table 1) showed their GAD activity in less than 24 h, like the control strain. The rapid increase in pH and the colour change in the L-glutamate medium of the ten strains corresponded to irreversible decarboxylation of L-glutamate to GABA molecule by the GAD enzyme. Cheese milk's biological origin may be related to high GAD activity, since only one strain was isolated from cow cheese, whereas 4 strains were isolated from sheep cheese and 4 from goat cheese. The most promising strain for GABA production was from a mixture of milks. In all cases, all cheeses were cured and fatty.

The 10 high-potential strains were selected for the next experimental step.

3.2. GABA production of selected strains in a sourdough medium

Fig. 1 shows the concentrations of GABA obtained from the 10 strains in the flour solution. 5 of them reached values greater than the control strain. Thus, after 24 h of non-optimized fermentation, the control strain had produced 0.83 mM GABA, while strains A, B, C, D and H reached 0.93 mM, 0.94 mM, 0.96 mM, 0.99 mM and 0.91 mM, respectively. These concentrations were consistent with the qualitative screening tests for GAD activity (Table 1).

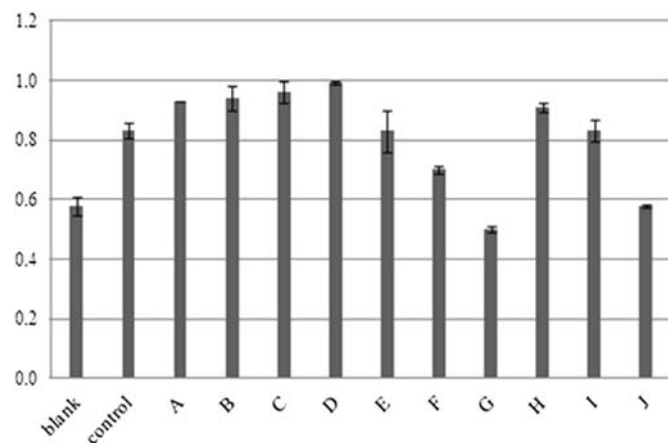


Fig. 1. GABA production by strains selected after qualitative assay. Data are the means of three independent experiments analyzed individually.

The four highest GABA-production strains isolated (A, B, C and D) were registered in the Spanish Type Culture Collection (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT) as part of the Patent Application number 201231349, since, according to the analysis described above, they surpass the performance of the control strain in the synthesis of GABA under the culture conditions proposed.

3.3. pH variation and kinetic growth

Table 1 shows the increase of pH in the screening test of strains A, B, C and D. The initial pH of glutamate medium was set at 4.7. After the incubation, it reached values above 6, indicating that there was GABA production.

Bacterial growth for the different strains was very similar (Table 1). The blank sample showed very intense growth (6.3×10^9 cfu ml⁻¹), due to the natural LAB population that increases spontaneously in the flour, while there was not a high increase in the inoculated samples. This was due to the short incubation time of samples.

3.4. Strain identification

The four highest GABA-production strains in the sourdough medium (Fig. 1) were characterized phenotypically (Table 2) and genotypically.

Genotypic characterization of the bacteria showed that strains classified as B, C and A corresponds to the same species, *L. brevis*.

The phenotypic results obtained for the four strains, shown in Table 2, constitute the biochemical profile, based on the fermentation of 50 carbohydrates producing organic acid, by monitoring the change in colour of bromocresol purple used as an indicator. Biochemical tests (Table 2) showed that they correspond to different strains, with variations in fermentation profiles.

This demonstrated the presence of a strong intra-strain fluctuation in carbohydrate metabolism patterns of *Lactobacillus* species. It is for this reason that the strains of *L. brevis* were registered in the Spanish Type Culture Collection (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT) under different names: CECT 8181 (B), CECT 8183 (C) and CECT 8182 (A). The one classified as D and registered as CECT 8184 corresponds to the specie *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, which was corroborated by biochemical tests.

4. Discussion

4.1. Screening test

Spain is a country of immense cultural and culinary tradition, wherein customs, varied orography and climate have meant that a wide range of cheeses coexist, each with their specific type of milk, curing, manufactured form, format and history. Artisan fermented food products with a medium or long ripening period, such as cheese, contain more amino acids than industrially produced cheeses, due to the high proportion of protein in the raw material and the activity of proteolytic enzymes and microorganisms involved in the process (Yvon & Rijnen, 2001). Lactic acid bacteria (LAB) are essential for the production of fermented foods.

In this study, 58 artisan cheeses were used to isolate lactobacilli species and determine their GAD activity. Another study reported by Siragusa et al. (2007) used 22 Italian Cheese varieties for the lactic acid bacteria isolation and screened for the capacity to synthesize GABA. However other traditional fermented foods such as kimchi (Lu, Chen, Gu, & Han, 2008; Park & Oh, 2007; Seok et al., 2008), sourdough (Rizzello et al., 2008) and paocai (Li, Cao, Gao & Xu, 2008) have been good sources to isolate LAB species/subspecies with GABA-producing ability. Physiologically, the expression of GAD

Table 2

Fermentation profiles of selected *Lactobacillus brevis* strains and *Lactococcus lactis* ssp *lactis*. +: Positive, -: negative; d: weak reaction; (1): 5% positive strains; (2): 7% positive strains; (3): 13% positive strains; (4): 1% positive strains.

Carbohydrate	Strains			
	<i>L. brevis</i> CECT	<i>L. brevis</i> CECT	<i>L. brevis</i> CECT	<i>L. lactis</i> CECT
	8183 (A)	8181 (B)	8182 (C)	8184 (D)
Glycerol	–	–	–	–
Erythritol	–	–	–	–
D-Arabinose	–	–	–	–
L-Arabinose	–	–	–	–
D-Ribose	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	–
L-Xylose	+	+	+	–
D-Adonitol	–	–	–	–
Methyl-βD-xylopyranoside	–	–	1	–
Galactose	–	–	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	d
L-Sorbose	–	–	–	–
L-Rhamnose	–	–	–	–
Dulcitol	–	–	–	–
Inositol	–	–	–	–
D-Mannitol	–	–	–	–
D-Sorbitol	–	–	–	–
Methyl-αD-mannopyranoside	–	–	–	–
Methyl-αD-glucopyranoside	–	–	–	–
N-acetylglucosamine	+	+	–	d
Amygdalin	+	+	+	–
Arbutin	–	–	–	+
Esculin ferric citrate	2	2	2	+
Salicin	+	+	+	+
D-Cellobiose	–	–	–	+
D-Maltose	–	–	–	+
D-Lactose	3	3	3	+
D-Melibiose	+	+	+	–
D-Saccharose	+	+	+	–
D-Trehalose	–	–	–	+
Inulin	–	–	–	–
D-Melezitose	–	–	–	–
D-Raffinose	–	–	–	–
Starch	–	–	–	+
Glycogeno	–	–	–	–
Xylitol	–	–	–	–
Gentiobiose	–	–	–	d
D-Turanose	–	–	–	–
D-Lyxose	–	–	–	–
D-Tagatose	–	–	–	–
D-Fucose	–	–	–	–
L-Fucose	–	–	–	–
D-Arabitol	–	–	–	–
L-Arabitol	–	–	–	–
Potassium gluconate	+	d	+	–
2-Ceto-gluconate	4	–	–	–
5-Ceto-gluconate	+	+	+	–

genes is assumed to control the acidification of the cytosolic environment by decarboxylating an acid substrate (glutamate) into a neutral compound (GABA) via incorporation of a proton (Cotter & Hill, 2003). This consumption of the intracellular proton is responsible for shifting the intracellular pH towards neutral, helping microbes to survive in the acidic environment (Yuko, Kiyoshi, & Ueno, 2011). By adjusting the pH to 4.7 in the acid-base indicator method, an acidic condition is achieved to activate the GAD enzyme. Moreover, pH of 4.2 and 4.7 are the optimum pH for *Lactobacillus* and *Lactococcus* GABA production (Yang et al., 2006). By these conditions and throughout GAD gene expression, which is dependent on the strain, GABA would then be exported into the extracellular environment, thereby contributing to alkalinization and so changing the medium's colour.

First, qualitative screening was conducted. Several methods have been published for this purpose, such as planar chromatography (PC) (Cho, Chang, & Chang, 2007) and enzyme-based microtitre plate assay (EBMPA) (Tsukatani, Higuchi, & Matsumoto, 2005). However, though PC and EBMPA seem to be suitable for a large number of samples, they require very expensive reagents or involve several experimental steps. Therefore, the pH Indicator Method suggested by Yang et al. (2006) was selected here.

4.2. Types of cheeses

Cheese was the food selected for the screening and isolation of GABA-producing lactic acid bacteria, although other food samples were also proposed. Several Spanish fermented sausages such as chorizo or 'longaniza' and dairy products like yoghurts, butter milk or cream also contain a variety of lactic acid strains, which has been added as culture starters. The homemade cheeses contain only wild strains, which show a wide range of metabolic activities and diverge greatly from the strains that are used as industrial culture starters (Klijn, Weerkamp, & de Vos, 1995) in fermented food products. In this study, in which 58 artisan cheeses were analyzed, we obtained a total of 65 positive strains of GABA production from 23 different cheeses. Among them, 10 strains resulted to be high GABA-producing. The type of cheese also plays a crucial role in the quality of metabolic strains, particularly the use of raw milk for manufacturing processes in which the craft is natural seeding. In this study, strains of sheep, goat or mixture cheese had more GABA-producing capacity than those of cow (Table 1). In the study reported by Siragusa et al. (2007) sheep ripened cheeses contained the highest levels of GABA and the highest GABA-producing LAB strains. This may be due to the dry-matter content, which is one of the factors that influence the suitability of milk for making cheese. Dry-matter content varies by race, the individual, lactation period and species. The type of microbial flora of the animal itself and access to them from different sources (udder, air, water washing, staff and milking equipment) also characterize the different types of cheeses. Therefore, the isolation of wild-type strains from traditional products to be used as functional starter cultures in food fermentation may be crucial.

4.3. GABA production of selected strains

In this study, the use of whole wheat flour probably allowed greater concentration of GABA than refined wheat flour (Table 1). This is due to the concentration of endogenous GABA, especially because the levels of glutamic acid and glutamate decarboxylase activity are higher in whole wheat grain than in white grain, although GABA production appears to be specific to each species.

It should be noted that the small percentage of GABA-producing strains found (11.2%) was similar to those found by Siragusa et al. (2007) (14%), who isolated 61 GABA-producing strains from 22 Italian cheeses. Although distinct in origin, the curing periods of both cheeses studied were the same. In addition, 17 GABA-producing LAB strains of 31 colonies from cheese (Nomura, Kimoto, Someya, Furukawa, & Suzuki, 1998) and 23 of 1000 from poacai (Li et al., 2008) were found indicating the high occurrence of GABA-producing LAB in some fermented foods. It is noteworthy that best GABA-producing strains were isolated from samples with high GABA content. For example, Siragusa et al. (2007) isolated the four best GABA-producing from four Pecorino cheeses which had the highest GABA levels (289–391 mg/kg). Nomura et al. (1998) screened four *L. lactis* with the highest GABA production from 4 commercial cheeses (Gouda, Cheddar, Blue and Edam) and reported highest levels of GABA (177.0, 48.0, 7.1 and 4.2 mg/kg, respectively). Therefore, it would be interesting in this project to determine the

GABA content of the 58 screened cheeses to establish any relation between *Lactobacillus* producing GABA strains and the isolation source.

4.4. Strain characterization

For this distinction, the API 50 CHB system was used, which according to Martínez (2008) is one of the methods most commonly used for identification at species level. Nigatu, Ahrné, and Molin (2000) demonstrated that the use of API 50 CH profiles for taxonomic purpose in most lactobacilli appears reproducible, but that the specific temperature for the species could affect the reproduction. The biochemical identification system API 50 CHB allows identification of the selected strains, although it is advisable to accompany it with confirmatory evidence.

4.5. GABA

In a human intervention trial, Shimada et al. (2009) used a dietary GABA-rich algae supplement and Inoue et al. (2003) studied a new fermented milk containing GABA in patients with mild hypertension. Both found a significant decrease in blood pressure. The natural GABA enrichment of food products is commercially a more interesting approach than its addition as a chemical ingredient and is particularly relevant to use in the food and biotechnology fields.

5. Conclusions

Based on the knowledge of the beneficial effects of GABA and the many studies that confirm this, this paper reports the high capacity of gamma-aminobutyric acid production of ten strains isolated from artisan Spanish cheeses. The results showed the high GABA-producing ability of the *L. brevis* strains, CECT 8183, CECT 8181, CECT 8182 and *L. lactis* ssp *lactis* CECT 8184, under non-optimized conditions, opening new ways of research to optimize the production of GABA and the possibility of creating co-cultures with these strains. Furthermore, the findings of this study make it possible to use these strains in the bakery industry to obtain health-promoting bakery foods that are rich in GABA.

To determine the free amino acid profile of the homemade Spanish cheeses with particular relevance on GABA content will be the perspective futures for this study in order to establish any correlation among amino acid concentration and the amount of lactic acid bacteria which could indicate specific microbial activity.

Acknowledgement

Supported by Europastry S.A., St. Cugat del Vallès, Barcelona, Spain.

References

- Cho, Y. R., Chang, J. Y., & Chang, H. C. (2007). Production of γ -amino-butyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*, 104–109.
- Cohen, S. A., & Michaud, D. P. (1993). *Analytical Biochemistry*, 211–279.
- Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*, 429–453.
- Guin Ting Wong, C., Bottiglieri, T., & Carter Snead, O., III (2003). GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology*, *6*, 3–12.
- Hall, L., Doerr, K. A., Wohlfiel, S. L., & Glenn, D. R. (2003). Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(4), 1447–1453.
- Hayakawa, K., Kimura, M., & Kamata, K. (2002). Mechanism underlying γ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, *438*, 107–113.
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., & Yamori, Y. (2004). Effect of γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *British Journal of Nutrition*, *92*, 411–417.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasaom, M., Hayakawa, K., Kimura, M., et al. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, *57*, 490–495.
- Kannel, W. B., Ho, K., & Thom, T. (1994). Changing epidemiological features of cardiac failure. *British Heart Journal*, *72*(Suppl.), S3–S9.
- Klijn, N., Weerkamp, A. H., & de Vos, W. M. (1995). Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 788.
- Li, H., Cao, Y., Gao, D., & Xu, H. (2008). A high γ -aminobutyric acid-producing ability *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai. *Annals of Microbiology*, *58*, 649–653.
- Lu, X., Chen, Z., Gu, Z., & Han, Y. (2008). Isolation of gamma-aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochemistry Engineering Journal*, *41*, 48–52.
- Martínez, J. F. (2008). *Desarrollo de métodos rápidos para el control del Bacillus cereus en alimentos* (Doctoral thesis). Valencia, Spain: University of Valencia, 212 pp.
- Nigatu, A., Ahrné, S., & Molin, G. (2000). Temperature-dependent variation in API 50 CH fermentation profiles of *Lactobacillus* species. *Current Microbiology*, *41*, 21–26.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., & Suzuki, I. (1998). Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *Journal Dairy Science*, *81*, 1486–1491.
- Oh, S. H., & Oh, C. H. (2003). Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Science and Biotechnology*, *12*, 248–252.
- Oh, S. H., Soh, J. R., & Cha, Y. S. (2003). Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *Journal of Medicinal Food*, *7*, 115–121.
- Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., et al. (2000). Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, *47*, 596–603.
- Park, K. B., & 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 Technology*, *98*, 1675–1679.
- Ricci, I., Artacho, R., & Olalla, M. (2010). Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *50*, 390–402.
- Rizzello, C. G., Cassone, A., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2008). Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(16), 6936–6943.
- Seok, J. H., Park, K. B., Kim, Y. H., Bae, M. O., Lee, M. K., & Oh, S. H. (2008). Production and characterization of kimchi with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid. *Food Science Biotechnology*, *17*, 940–946.
- Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T., et al. (2009). Anti-hypertensive effect of γ -aminobutyric acid (GABA)-rich *Chlorella* on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clinical and Experimental Hypertension*, *31*, 342–354.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*, 7283–7290.
- Tsukatani, T., Higuchi, T., & Matsumoto, K. (2005). Enzyme-based microtiter plate assay for gamma-aminobutyric acid: application to the screening of gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria. *Analytica Chimica Acta*, *540*, 293–297.
- Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., & Oda, K. (1997). Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *61*, 1168–1171.
- Yang, S., Lu, Z., Lu, F., Bie, X., Sun, L., & Zeng, X. (2006). Simple method for rapid screening of bacteria with glutamate decarboxylase activities. *Journal of Rapid Methods and Automation of Microbiology*, *14*, 291–298.
- Yuko, W., Kiyoshi, H., & Ueno, H. (2011). Effects of co-culturing LAB on GABA production. *International Journal of Biological Macromolecules*, *11*(1), 3–13.
- Yvon, M., & Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, *11*, 185–201.

4.2 Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content

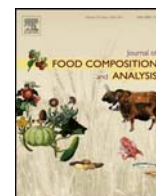
Marina Diana, Magdalena Rafecas, Cristina Arco & Joan Quílez
Food Composition and Analysis (2014), 35, 94-100

Índice de impacto (2014): 2,259

Categoría: Food Science and Technology, 32 de 123 (2º cuartil)

Resumen:

En esta publicación se recoge el contenido aminoacídico de los 34 quesos artesanales Españoles usados previamente para el aislamiento de las bacterias lácticas, con especial interés en el GABA y la Ornitina. Los aminoácidos fueron determinados mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con derivatización precolumna, separación en fase reversa y detección ultravioleta. El contenido total de aminoácidos en los quesos varió entre 0,19 g/kg y 67,95 g/kg y se encontraron considerables cantidades de GABA (media de 330 ± 50 mg/kg) y Ornitina (media de 450 ± 60 mg/kg) indicando actividades microbianas específicas. Se realizó una evaluación estadística de la influencia del grado de curación (fresco, semicurado y curado) y el tipo de leche (cabra, vaca, oveja y mixta) para las concentraciones de GABA y ornitina y se constató que las concentraciones de GABA no estaban influidas por el tipo de curación ni el origen de la leche ($p < 0,05$); sin embargo, la concentración de ornitina en el queso hecho de leche de vaca fue estadísticamente más alto ($p < 0,05$) que aquellos originarios de cabra, independientemente de si los productos estaban curados o semicurados. Se abren vías de trabajo para corroborar el supuesto efecto bioactivo de estos componentes presentes en los quesos artesanales Españoles.



Original Research Article

Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: Importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content

Marina Diana^{a,b,*}, Magdalena Rafecas^a, Cristina Arco^a, Joan Quílez^{b,c}^a Nutrition and Food Science Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain^b Technology Department, Europastry, S.A., Spain^c Human Nutrition Unit, School of Medicine, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2014

Received in revised form 23 May 2014

Accepted 5 June 2014

Keywords:

Gamma-aminobutyric acid

Ornithine

Amino acids

Cheese

Ripening

Lactic acid bacteria

Bioactive non-nutrient

Food analysis

Food composition

HPLC

ABSTRACT

The content of 18 free amino acids in 34 Spanish artisanal cheeses was measured. The amino acids were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with pre-column derivatization, reversed-phase separation, and UV detection. The total content of free amino acids in the cheese samples ranged from 0.19 g/kg to 67.95 g/kg. The amount of lactic acid bacteria (LAB), the main microflora in cheese, is also reported. Considerable amounts of free amino acids, such as gamma-aminobutyric acid (GABA; average 330 ± 50 mg/kg) and ornithine (Orn; 450 ± 60 mg/kg), were found in some samples, thus indicating specific microbial activities. GABA concentrations were not influenced by the kind of ripening or milk origin ($p < 0.05$); however, the concentration of Orn in cheese made from cow's milk was higher ($p < 0.05$) than that found in cheese made from goat's milk, regardless of whether these products were ripened or semi-ripened. These amino acids are considered potentially bioactive because of their various physiological activities which are beneficial for health.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cheese is widely consumed in Spain. Several types of cheese are internationally renowned, such as Manchego from the region of La Mancha and Idiazábal from the Basque Country. Some traditional specialities are classified as “Protected Designations of Origin” or “PDO” (D.O.P.-*Denominación de Origen Protegida*) by Spain and the European Union. Cheese is defined as the fresh or matured product obtained by coagulation of dairy products such as milk, cream, skimmed (or semi-skimmed) milk, buttermilk, or a mixture of these. It is easily digestible and rich in nutritional components, thus constituting an important source of vitamins, minerals and other trace elements, such as amino acids and proteins. Cheeses

undergo various types of ripening. Fresh cheese has no curing period, while semi-ripened cheese is matured for more than 1 month. In ripened or cured cheeses, maturation is extended (at least 3 months), leading to a stronger and more persistent flavour. Proteolysis, a major process during cheese ripening, contributes to the textural and sensory changes in the cheese matrix caused by degradation products, amino acids and peptides (González de Llano et al., 1991b). The sensory properties of cheese are also conferred by the complex community of lactic acid bacteria (LAB), responsible for fermentation during the cheese-making process.

In addition to nutrients, some foods contain a number of substances that do not have a defined nutritional function but may have a significant impact on health. These bioactive substances have recently attracted the attention of the food and pharmaceutical industries. Recent studies have reported the bioactive functions of the non-proteinogenic or free amino acids (FAAs) gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine (Orn). Kurata et al. (2011) demonstrated the sedative and hypnotic effects of L-ornithine in rats exposed to acute stress. Orn also attenuates fatigue by increasing the efficiency of energy consumption and promoting the excretion of ammonia (Sugino et al., 2008). Another

Abbreviations: Glu, glutamic acid; Leu, leucine; Lys, lysine; Val, valine; Pro, proline; Phe, phenylalanine; Ileu, isoleucine; Leu, leucine; Met, methionine; GABA, gamma-aminobutyric acid; Orn, ornithine; Arg, arginine.

* Corresponding author at: Nutrition and Food Science Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain.

Tel.: +34 93 402 4508; fax: +34 93 403 5931.

E-mail addresses: marinadiana@ub.edu, marinadiana28@gmail.com (M. Diana).

functionally active molecule is GABA. This amino acid induces hypotension in animal models (Hayakawa et al., 2004), as well as in human intervention trials (Inoue et al., 2003; Shimada et al., 2009). GABA also shows diuretic and tranquilizing effects (Wong et al., 2003), and it has been used to treat alcoholism (Oh et al., 2003) and depression (Okada et al., 2000). In addition, this compound stimulates immune cells (Oh and Oh, 2003). Furthermore, GABA contributes to increasing the concentration of growth hormone in plasma and the rate of protein synthesis in the brain (Tujioka et al., 2009). Recent studies indicate that it is a potent secretor of insulin and thus could help to prevent diabetes (Adeghate and Ponery, 2002). This amino acid has been introduced as a functional ingredient in a variety of products, mainly in Asia (Li and Cao, 2010). However, little attention has been given to Orn.

Here we determined the FAA profile, concentrating on GABA and Orn, of 34 types of traditionally made Spanish cheese. LAB, the main microflora in cheese, was also measured. The content of GABA and Orn could serve as markers of specific microbial activities and thus may have a functional value in cheese.

2. Materials and methods

2.1. Cheese samples and preparation

Cheeses were purchased from farms throughout Spain and from artisanal markets, mainly in the region of Catalonia, NE Spain. A portion of each cheese was grated in a laboratory knife mill (Grandmix GM 200) at 5000 rpm for 20 s and stored in the freezer until analysis.

2.2. FAA determination

FAAs were determined following the method of Cohen and Michaud (1993) with some modifications. Amino acids were extracted by dispersing 0.5 g of grated cheese in a 0.1 M hydrochloric acid solution containing 2.5 mM of norleucine as an internal standard. For deproteinization, the sample was centrifuged, and 500 μ L of the filtered supernatant was added to 500 μ L of a 400 g/L trichloroacetic acid solution. After keeping the suspension in an ice bath for 10 min, the sample was centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was then filtered and left to evaporate completely in a SpeedVac concentrator (SpeedVac Plus AR SC110 centrifuge, Savant Instruments, Inc, Farmingdale, NY, USA). The evaporated sample was then resuspended in 500 μ L of borate buffer, and the pH of the sample solution was raised to at least 8.5 before derivatization. Amino acids were pre-column derivatized, as follows: 10 μ L of filtered sample were mixed with 70 μ L of AccQ-fluor borate buffer in a sample tube and the solution was briefly vortexed. Then, 20 μ L of reconstituted AccQ-Fluor reagent (3 mg of 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxy-succinimidyl carbamate in 1 mL of acetonitrile) (Waters, Cerdanyola del Vallès, Spain) was added and the mixture was immediately mixed. The tube was covered with parafilm and left to stand for 1 min at room temperature. It was then heated in a heating block (Stuart Scientific SHT200D, Bibby Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) at 55 °C for 10 min. After the addition of 100 μ L of Eluent A, sample was ready to inject.

The HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) consisted of a 600E quaternary pump, an in-line degasser 4-channel and a model 717 Waters plus autosampler equipped with a 10 μ L sample loop (Waters Corporation, Milford). Chromatographic separation was carried out in a Waters AccQ.Tag amino acid analysis Nova-Pak™ column (3.9 mm \times 150 mm, 4 μ m) fitted with a Nova-Pak™ C₁₈ Sentry™ Guard column (3.9 mm \times 20 mm, 4 μ m). The column was thermostatted at 37 °C with a model 7970 column block-heater manufactured by

Jones Chromatography LTD (Hengoed, Wales, UK) and the flow rate was 1.0 mL/min. The injection volume was 10 μ L. Mobile phase A consisted of AccQ.Tag eluent A (100 mL AccQ.Tag A concentrate + 1 L Milli-Q water and mixing). Mobile phases B and C were acetonitrile (HPLC grade) and Milli-Q water, respectively. The best gradient separation programme was as follow: time = 0 min, A:B:C (100:0:0); time = 0.5 min, A:B:C (100:0:0); time = 18 min, A:B:C (95:5:0); time = 19 min, A:B:C (91:9:0); time = 29.5 min, A:B:C (83:17:0); time = 38 min, A:B:C (0:60:40); time = 41 min, A:B:C (100:0:0). In addition, UV-absorbance detection (Waters 2487 UV detector) was used to determine AQC-derivatized amino acids. Each sample was analyzed twice.

2.3. Microbial count

For the microbiological analysis, 10 g taken from the interior of each cheese was weighed and homogenized with 100 mL of buffered peptone water (AES Chemunex, Terrassa, Spain). Decimal dilutions of the homogenates were prepared with buffered peptone water. Next, 1 mL of the dilutions was seeded in a sterile Petri plate, to which 15 mL of Man-Rogosa-Sharpe agar (AES Chemunex, Terrassa, Spain) was added. The plate was then allowed to cool. Subsequently, viable bacterial colonies were counted after incubation at 30 °C under anaerobic conditions (BD GasPak Ez ContainerSystems, Sparks, MD, USA) for 48 h. For each product, two samples were assayed, and each assay was performed in triplicate.

2.4. Statistical analysis

A likelihood ratio test was applied by adjusting a linear regression model considering milk, type of ripening and their interaction as factors. Comparison of means between subgroups was made by POST-HOC analysis. For all cases, *p*-values less than 0.05 were considered significant. Principal component analysis (PCA) was also performed on pooled FAA concentration and LAB using a correlation matrix. All statistical evaluations were carried out using the SPSS 15.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Total FAA content

Eighteen FAAs were characterized from the 34 Spanish artisanal cheeses. The total FAA contents, including GABA and Orn, are given in Table 1. We tested 19 ripened, 12 semi-ripened, and 3 fresh cheeses collected from around Spain. The total FAA content ranged from 0.19 g/kg to 67.95 g/kg. Table 1 shows the individual and total content of FAAs based on the milk origin (16 from ewes; 9 from goats; 5 from cows and 4 from mixed milks), the type of ripening, and the *lactobacillus* cell count. The highest amino acid content (67.95 g/kg) was detected in a semi-ripened mixed-milk cheese (sample 23) while the lowest (0.19 g/kg) was found in a fresh cheese made from cow's milk (sample 17). The mean total amino acid content in the samples was 18.02 ± 2.59 g/kg.

3.2. Individual amino acid content

Table 1 shows the 18 individual FAAs for the samples. Glu, Leu, Lys, Val and Pro had the highest concentrations. The content of these five amino acids in the total samples was 99.48, 77.87, 61.60, 52.82 and 43.99 g/kg; which represent 16.2%, 12.7%, 10.1%, 8.62% and 7.18% of the total FAA pool, respectively. The highest content of GABA was 0.98 g/kg, a concentration detected in two ripened cheeses made from ewe's milk (number 5 and 26) (Table 1). Other semi-ripened and fresh goat's milk cheeses showed high GABA concentrations (0.93 and 0.90 g/kg, respectively). Orn concentrations ranged between 0.07 and 1.59 g/kg, indicating microbial

Table 2
ANOVA tests of milk origin vs. type of ripening for ORN concentrations (likelihood ratio test).

(a) Type of ripening vs. milk origin						
Difference ripened–semi-ripened						
	Mean	IC 95%		p-Value		
Cow	0.04	−0.45	0.53	0.873		
Goat	0.02	−0.39	0.43	0.932		
Mixed	−0.22	−0.71	0.27	0.379		
Ewe	−0.68	−0.99	−0.37	<0.0001 ^P		
(b) Milk origin vs. type of ripening						
Milk differences						
	Difference		Mean	IC 95%	p-Value	
Ripened	Cow	Goat	0.50	0.01	0.99	0.0479 ^P
	Cow	Mixed	0.35	−0.15	0.84	0.1679
	Cow	Ewe	0.25	−0.12	0.62	0.1917
	Goat	Mixed	−0.15	−0.64	0.34	0.5488
	Goat	Ewe	−0.25	−0.62	0.13	0.1938
Semi or fresh	Mixed	Ewe	−0.10	−0.47	0.28	0.6100
	Cow	Goat	0.47	0.06	0.88	0.0238 ^P
	Cow	Mixed	0.09	−0.41	0.58	0.7340
	Cow	Ewe	−0.47	−0.92	−0.02	0.0389 ^P
	Goat	Mixed	−0.39	−0.80	0.02	0.0638
Goat	Ewe	−0.95	−1.30	−0.59	<0.0001 ^P	
	Mixed	Ewe	−0.56	−1.00	−0.11	0.0148 ^P

^P Values showed significant differences ($p < 0.05$).

activity in the samples. Ewe's milk origin presented statistically higher ($p < 0.05$) Orn concentrations in semi-ripened cheeses (Table 2). Furthermore, Orn concentrations in cheese made from cow's milk were statistically higher ($p < 0.05$) than that made from goat's milk, regardless of whether they were ripened or semi-ripened (Table 2). However, GABA concentrations showed no statistical significance for the kind of ripening or the milk origin ($p > 0.05$) (Table 3). The factor analysis of the loading of individual amino acid and LAB contents is shown in Fig. 1. PC1 explained 67% of the total variance, and the FAAs that correlated best with this PC

Table 3
GABA and ornithine (ORN) content on cheeses in g/kg.

	Ripened	Semi-ripened	Fresh	Total
GABA				
Ewe	0.40 ± 0.34 n = 13	0.41 ± 0.31 n = 3	n = 0	0.40 ± 0.32 n = 16
Goat	0.06 ± 0.04 n = 2	0.34 ± 0.39 n = 5	0.65 ± 0.35 n = 2	0.35 ± 0.37 n = 9
Cow	0.17 ± 0.21 n = 2	0.15 ± 0.14 n = 2	0.01 n = 1	0.13 ± 0.14 n = 5
Mixed	0.21 ± 0.18 n = 2	0.22 ± 0.21 n = 2	n = 0	0.21 ± 0.16 n = 4
Total	0.32 ± 0.31 n = 19	0.31 ± 0.30 n = 12	0.44 ± 0.45 n = 3	0.33 ± 0.31 n = 34
ORN				
Ewe	0.40 ± 0.27 n = 13	1.08 ± 0.63 ^P n = 3	n = 0	0.52 ± 0.43 n = 16
Goat	0.15 ± 0.03 n = 2	0.13 ± 0.06 n = 5	0.88 ± 0.11 n = 2	0.30 ± 0.33 n = 9
Cow	0.65 ± 0.09 n = 2	0.61 ± 0.39 n = 2	0.01 n = 1	0.50 ± 0.34 ^P n = 5
Mixed	0.30 ± 0.04 n = 2	0.52 ± 0.28 n = 2	n = 0	0.41 ± 0.21 n = 5
Total	0.39 ± 0.26 n = 19	0.51 ± 0.50 n = 12	0.58 ± 0.51 n = 3	0.45 ± 0.37 n = 34

Data are mean ± SEM.

n, number of samples

No statistical significance was found for the milk origin and the type of ripening. p, value significantly higher ($p < 0.05$).

were Phe, Val, Ileu, Leu, Met, Glu and Lys, which is in agreement with the results reported by Poveda et al. (2004). The FAAs that best correlated with PC2 (which accounted for 8% of total variance) were GABA and Arg. LAB was located on the negative side of the PC2, implying that it has no correlation with free or total amino acid content. GABA, Orn, and Arg showed low correlation with the rest of the amino acids. This finding could be explained by the effects of microbial activity on the production of these amino acids.

3.3. Viable lactobacillus count in the cheese samples

The number of *lactobacilli* in the samples is shown in Table 1. A wide variation in total cfu/g (from 7.3×10^3 to 3.25×10^8) was detected. The LAB count showed a low correlation with the mostly amino acids present in the cheeses. Nevertheless, the correlation with GABA and arginine was higher (Fig. 1).

4. Discussion

The purpose of this work was to compare the concentrations of FAAs in a variety of Spanish cheeses, with particular emphasis on GABA and Orn, both considered functional amino acids. Here we report the total FAA profile of 34 artisanal Spanish cheeses. The total FAA content ranged between 0.19 g/kg and 67.95 g/kg. The mean total amino acid content in the samples was 18.02 ± 2.59 g/kg. This value is similar to that reported by Poveda et al. (2004) in Manchego cheese (ewe's milk cheese) ripened for 150 days. Several studies have addressed GABA content in cheese; but little attention has been paid to Orn as a bioactive component. However, a recent study by Kurata et al. (2011) demonstrated the sedative and hypnotic effect of oral administration of L-ornithine in neonatal chicks exposed to stress. Orn has also been used to treat cirrhosis, because it facilitates the removal of toxic ammonia from the liver (Sugino et al., 2008). Although the body is able to produce its own supply of Orn, here we show that many varieties of Spanish cheese are a good source of this amino acid. The concentration of Orn in our samples ranged between 0.07 g/kg and 1.59 g/kg. This range is higher than that found by Pinho et al. (2001) (from traces to 4 mg/kg). Orn is formed by the decarboxylation activity of LAB metabolism through the precursors arginine and citrulline during the early stages of ripening. This observation would therefore explain why the highest mean concentration of Orn was found in semi-ripened cheeses and the closer positions of LAB and Arg in the scatter plot of the PCA (Fig. 1). From semi-ripening onwards, the content of this amino acid drops, possibly because of degradation by arginase activity.

In contrast, studies of the hypotensive effect of GABA are numerous. The arterial pressure in spontaneously hypertensive rats and in hypertensive humans decreases in response to the consumption of food rich in GABA, as shown by Hayakawa et al. (2004) and Kajimoto et al. (2004), respectively. A daily intake of 100 mL of fermented milk containing between 10 and 12 mg of GABA for 12 weeks has also been shown to reduce blood pressure in hypertensive patients (Inoue et al., 2003). Here we present the maximum concentration of GABA found in two Spanish cheeses (980 mg/kg) (samples 5 and 26). Our findings indicate that these cheese varieties could help to lower blood pressure. This is supported by a recent study performed by Pouliot Mathieu et al. (2013) which showed that a concentration of 16 mg of GABA led to a decrease of 3.5 ± 2.8 mmHg in mean blood pressure and 5.5 ± 3.9 mm Hg for systolic pressure in individuals consuming 50 g of experimental cheese daily for twelve weeks. By the consumption of 50 g of our highest GABA content cheeses, the GABA intake would be three-fold higher (49 mg) compared with the experimental cheese in Pouliot Mathieu et al. (2013).

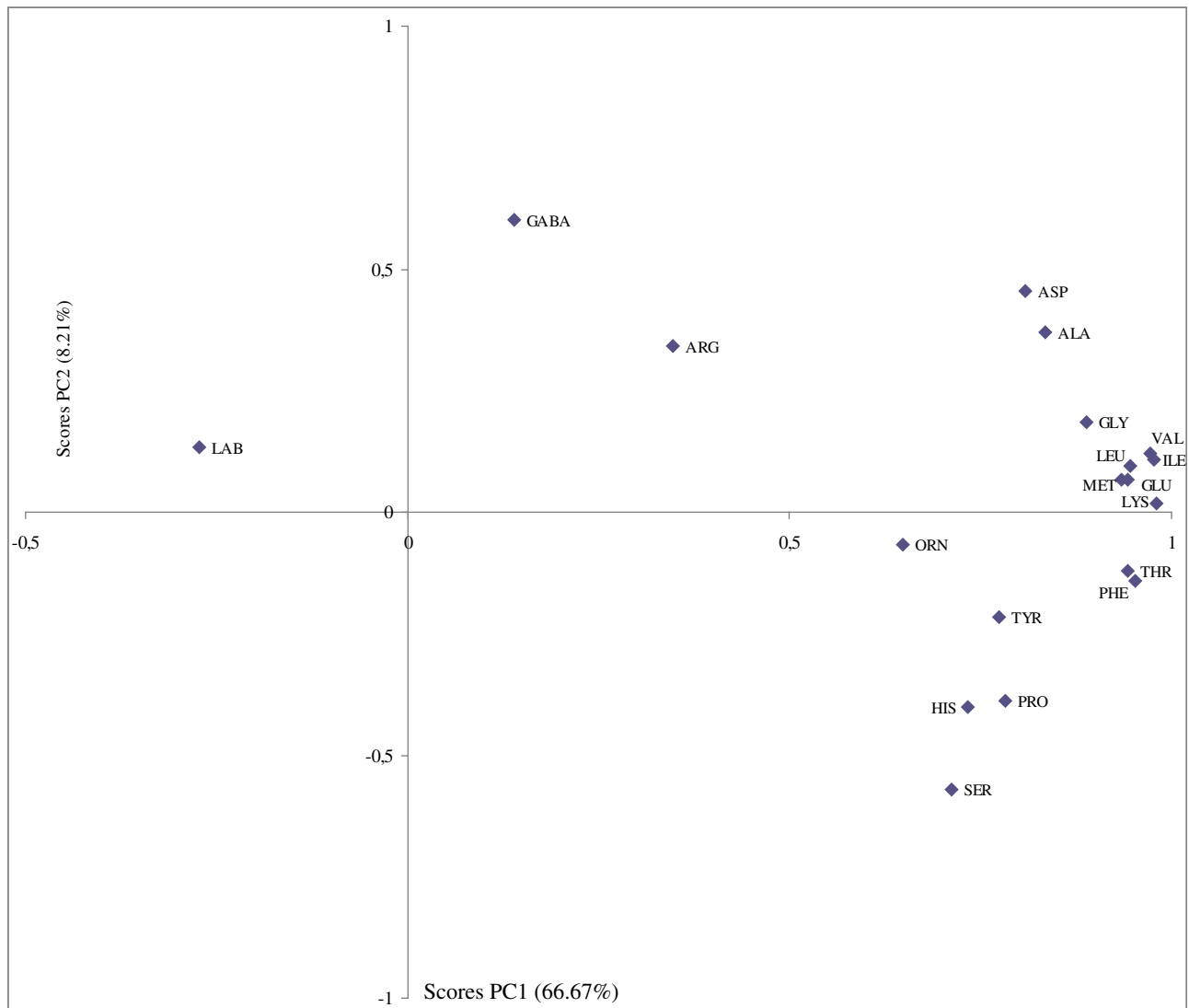


Fig. 1. PCA scores plot of all amino acids and lactic acid bacteria (LAB) analyzed in the 34 cheeses.

In Italy, Siragusa et al. (2007) also reported high concentrations of GABA in several mature cheeses, with ewe's milk cheeses ripened for 5 months containing the highest concentrations: 289 and 391 mg/kg in Pecorino Marchigiano and Pecorino Filiano, respectively. Nomura et al. also analysed 7 commercial varieties of cheese (Camembert, Gouda, Blue, Cream, Cheddar, Edam and Emmental) and reported concentrations of 177.0, 48.0, 7.1 and 4.2 mg/kg of GABA for Gouda, Cheddar, Edam and Blue cheese, respectively. Wang et al. (2010) reported on the benefits of a new probiotic cheese. They manufactured a cheddar cheese, rich in GABA and high ACE-inhibitory activity, which was fermented with a *Lactobacillus casei* starter previously isolated from Chinese koumiss-derived. The GABA content of this experimental cheese reached 677.35 mg/kg, which is below the high concentrations reported in the present study (6 samples exceeded this value). Moreover, they concluded that the amount of GABA was sufficient to have a functional value and proposed the further development of this probiotic food.

Hypertension is a major cause of cardiovascular diseases, which account for the greatest number of hospital admissions and deaths in Spain. Currently, the daily consumption of cheese in Spain is 21.8 g per person (MAGRAMA, 2013). The mean GABA

content in the varieties of Spanish cheeses analysed was 330 mg/kg; therefore, prospective clinical trials on the functional physiological value of these products may be pertinent for hypertension management.

Although the samples showed wide variations in the total FAA content, the type of ripening, and the quantities of proteins in the raw materials used for the production, it has been shown that native microflora called "non-starter LAB" and the activity of proteolytic enzymes in the dairy procedures are the main factors responsible for amino acid release (Yvon and Rijnen, 2001). We did not find significant differences in the total FAAs on the basis of milk origin ($p < 0.05$), although we did show that the highest amino acid content belongs to a mixed-milk cheese followed by a cheese made from cow's milk. Furthermore, the lower concentration of FAAs found may be explained by a faster degradation of these compounds. The major impact on the total FAA content on cheese occurs during ripening, because during this process the breakdown of caseins, hydrolysed by rennet and other microbial enzymes, produces small compounds such as amines and amino acids (Eren-Vapur and Ozcan, 2012). The compounds released are precursors for many amino acids not present in caseins, namely Glu for alpha- and gamma-aminobutyric acid and Arg for Orn and citrulline.

Non-starter microflora and the addition of starters, mainly LAB, also contribute to the total FAA content, although we only found correlation with GABA and Arg (Fig. 1). Many studies have reported that the proteolytic activity of LAB during cheese ripening produces a higher content of short-chain peptides and FAAs (Lee et al., 1990). This metabolic activity is based on the enzyme system of these bacteria and the degree of autolysis in the cheese, thus generating flavour compounds.

Furthermore, the release of FAAs is significantly influenced by the salt content. Spanish artisanal cheeses contained between 0.5% and 2% of salt. Although the salt content of the cheese samples is not shown in this report, the higher the salt percentage, the longer starter culture activity is delayed. This observation can be attributed to the unfavourable environmental conditions, since high salt concentrations lead to lower viable microbiological counts (Freitas and Malcata, 1996). Moreover, when salt concentration is high, there are fewer water molecules to interact with the charged part of the protein, and therefore the protein interaction is stronger, inhibiting the free amino acid release. Freitas et al. (1999) demonstrated that those cheese varieties that are salted twice have lower concentrations of FAAs. Other factors that contribute to the total FAA of cheese include pH and storage temperature (Vale and Gloria, 1997). Pinho et al. (2001) showed that the total FAA content in this product, particularly Val and Leu, increases as the storage temperature rises. In this regard, Val and Leu may serve as indicators of temperature changes in ripened cheese.

In general, all the samples analyzed in this work showed a high content of Glu, which could be due to the high percentage of this amino acid in casein and its formation from Gln, Val, Leu and Ile. Vicente et al. (2001) found the same Glu, Leu and Val content in a ripened cheese (Idiazábal cheese), while others reported Leu, Glu, Val and Phe as the main amino acids (Lavanchy and Sieber, 1993; Freitas et al., 1999). The least abundant FAAs were Arg, followed by secondary amino acids such as GABA and Orn. This observation may indicate that the release of Arg is slower than its conversion to Orn. The type of rennet can also affect the FAA content, since cheeses made with artisanal lamb rennet have higher concentrations of GABA than those made with commercial calf rennet (Vicente et al., 2001). The concentration of this amino acid can also be explained by the LAB present in the cheese. GABA is not found in caseins and is formed by the irreversible decarboxylation of glutamate through the glutamic acid decarboxylase (GAD) enzyme, which is dependent on *Lactobacillus* strains (Li and Cao, 2010). Since caseins are rich in glutamate, the formation of GABA by LAB during proteolysis may have a considerable effect on its total content in cheese. Furthermore, GAD activity is restricted by the pH medium. Nomura et al. (1998) reported that GABA production increases linearly as the pH of cheese decreases.

5. Conclusion

Here we have reported on the pattern of FAAs in several types of Spanish cheese and the natural presence of compounds with bioactive effects such as GABA and ornithine (Orn). Moreover, most of the cheese samples contained important counts of LAB, which may explain the high levels of GABA and Orn synthesis and proteolytic activity. Although GABA has been shown to lower blood pressure, further studies are needed to assess its hypotensive effect through cheese intake. In this regard, it would be pertinent to test the effects of consuming Spanish cheese with a high GABA content on blood pressure in humans. Moreover, further studies are required to explore the positive effects of Orn to be considered for inclusion in functional food since it demonstrates potential anxiolytic-like and detoxifying effects.

Acknowledgement

This research was supported by Europastry S.A., Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain.

References

- Adeghate, E., Ponery, A.S., 2002. GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue & Cell* 34, 1–6.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P., 1993. *Analytical Biochemistry* 211, 279.
- Eren-Vapur, U., Ozcan, T., 2012. Determination of free amino acids in cheese. *Mljekarstvo* 62 (4) 241–250.
- Freitas, A.C., Malcata, F.X., 1996. Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical and proteolysis characteristics of ovine cheese. *Journal of Agriculture and Food chemistry* 6, 1099–1116.
- Freitas, A.C., Fresno, J.M., Prieto, B., Franco, I., Malcata, F.X., Carballo, J., 1999. How milk type, coagulant, salting procedure and ripening time affect the profile of free amino acids in Picante da Beira Baixa cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 611–618.
- González de Llano, D., Polo, M.C., Ramos, M., 1991b. Production, isolation and identification of low molecular mass peptides from blue cheese by high performance liquid chromatography. *Journal Dairy Research* 58, 363–372.
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., Yamori, Y., 2004. Effect of γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *British Journal of Nutrition* 92, 411–417.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasaom, M., Hayakawa, K., Kimura, M., Sansawa, H., 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition* 57, 490–495.
- Kajimoto, O., Hirata, H., Nakagawa, S., Kajimoto, Y., Hayakawa, K., Kimura, M., 2004. Hypotensive effect of fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in subjects with high normal blood pressure. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 51, 79–86.
- Kurata, K., Nagasawa, M., Tomonaga, S., Aoki, M., Morishita, K., Denbow, D.M., Furuse, M., 2011. Orally administered L-ornithine elevates brain L-ornithine levels and has an anxiolytic-like effect in mice. *Nutritional Neuroscience* 14, 243–248.
- Lavanchy, P., Sieber, R., 1993. Proteolyse in verschiedenen Hart- und Halbhartkäsen. 1. Freie Aminosäuren. *Schweiz Milchw Forsch* 22, 59–64.
- Lee, B.M., Laleye, L.C., Simard, R.E., Hollay, R.A., Emmons, D.B., Giroux, R.N., 1990. Influence of homofermentative lactobacilli on physicochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Food Science* 55 (2) 386–390.
- Li, H., Cao, Y., 2010. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids* 39, 1107–1116.
- MAGRAMA, 2013. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, <http://www.magrama.gob.es>.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., Suzuki, I., 1998. Production of γ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *Journal Dairy Science* 81, 1486–1491.
- Oh, S.H., Soh, J.R., Cha, Y.S., 2003. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *Journal of Medicinal Food* 7, 115–121.
- Oh, S.H., Oh, C.H., 2003. Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Science and Biotechnology* 12, 248–252.
- Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R., Takahashi, T., 2000. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 47, 596–603.
- Pinho, O., Ferreira, I., Mendes, E., Oliveira, B., Ferreira, M., 2001. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine during storage of Azeitao cheese. *Food Chemistry* 75, 287–291.
- Pouliot Mathieu, K., Gardner-Fortier, C., Lemieux, S., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Vuilleumard, J.-C., 2013. Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing acid lactic bacteria on blood pressure in men. *Pharmaceuticals* 1, 1–8.
- Poveda, J.M., Cabezas, L., McSweeney, P.H.L., 2004. Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chemistry* 84, 213–218.
- Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, T., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T., Matsubayashi, T., 2009. Anti-hypertensive effect of γ -aminobutyric acid (GABA)-rich cholella on high normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clinical and Experimental Hypertension* 31, 342–354.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R., Gobbetti, M., 2007. Synthesis of γ -aminobutyric acid by Lactic Acid Bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7283–7290.
- Sugino, T., Shirai, T., Kajimoto, Y., Kajimoto, O., 2008. L-Ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutrition Research* 28, 738–743.

- 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. *Journal Nutrition Science Vitaminology* 55, 78–80.
- Vale, S.R., Gloria, M.B.A., 1997. Determination of biogenic amines in cheese. *Journal of AOAC International* 60, 651–657.
- Vicente, M.S., Ibáñez, F.C., Barcina, Y., Barron, L.J.R., 2001. Changes in the free amino acid content during ripening of Idiazabal cheese: influence of starter and rennet type. *Food Chemistry* 72, 309–317.
- Wang, H.K., Dong, C., Chen, Y.F., Cui, L.M., Zhang, H.P., 2010. A new probiotic cheddar cheese with high ACE-Inhibitory activity and γ -aminobutyric acid content produced with koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang. *Food Technology and Biotechnology* 48, 61–70.
- Wong, G.T., Bottiglieri, T., Carter Snead III, O., 2003. GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology* 6, 3–12.
- Yvon, M., Rijnen, L., 2001. Cheese flavour formation by amino acid metabolism. *International Dairy Journal* 11, 185–201.

4.3 Free amino acids, acrylamide and biogenic amines in gamma aminobutyric acid enriched sourdough and commercial breads

Marina Diana, Magdalena Rafecas & Joan Quílez
Journal of Cereal Sciences (2014), *in press*

Índice de impacto (2014): 1,943

Categoría: Food Science and Technology, 38 de 123 (2º cuartil)

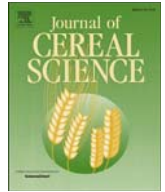
Resumen:

En este trabajo se examinó el perfil de aminoácidos libres, incluyendo el GABA y la Ornitina, así como el contenido en aminas biógenas y acrilamida en tres tipos de panes que difieren en un proceso de elaboración y fermentación. Se analizaron 11 panes comerciales y 12 panes tradicionales de supermercados y panaderías artesanales, respectivamente del área de Barcelona y sus resultados fueron comparados con los del pan experimental rico en GABA desarrollado en este proyecto. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos de panes en cuanto al valor de pH, la acidez total titulable (TTA), la concentración de GABA, el contenido total de aminoácidos libres y el nivel de acrilamida. La mayor síntesis de GABA ($24,2 \pm 0,87$ mg/100g) y la presencia de tiramina (41,8 g/kg) como la única amina encontrada fue observado en el pan experimental.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cereal Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcs

Free amino acids, acrylamide and biogenic amines in gamma-aminobutyric acid enriched sourdough and commercial breads

Marina Diana ^{a, b, *}, Magdalena Rafecas ^a, Joan Quílez ^{b, c, d}

^a Nutrition and Food Science Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

^b Technology Department, Europastry, S.A., Spain

^c Human Nutrition Unit, School of Medicine, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

^d CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 March 2014

Received in revised form

23 June 2014

Accepted 24 June 2014

Available online xxx

Keywords:

Breads

Gamma-aminobutyric acid

Sourdough

Blood pressure

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the free amino acid profile, including gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine, as well as the biogenic amine and acrylamide content in three types of breads that differed in their baking process and type of fermentation. Eleven commercial breads and twelve artisan sourdough breads from supermarkets and artisan bakeries, respectively, in Barcelona (Spain) were analyzed and compared with experimental bread designed to lower blood pressure and developed at a pilot plant. The experimental bread contained 21% of sourdough rich in GABA (98.2 mg/100 ml) with potassium citrate (0.13%) to partially replace common salt. Significant differences ($p < 0.05$) were found between the two groups of breads in pH value, total titratable acidity, GABA concentration, total free amino acid content and acrylamide level. The highest synthesis of GABA (24.2 ± 0.87 mg/100 g) and the presence of tyramine (41.8 mg/kg), which was the only biogenic amine found, were observed in the experimental sourdough bread.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bread is one of the staple foods in the human diet and, in all of its forms; it is the most widely consumed food in the world. It is considered a good source of carbohydrates, nutrients such as magnesium, iron, selenium and B-group vitamins, and dietary fiber, especially wholemeal bread. The baking process, fermentation and quality of the ingredients, which are mainly flour and water, make bread a food product with unique nutritional, organoleptic and rheological characteristics. It is well known that sourdoughs improve bread texture and flavor, and enhance sensorial and nutritional features. The long fermentation of dough using naturally occurring yeasts and *lactobacilli* prolongs the storage life of sourdough bread and has positive effects on the bread's technological, nutritional and functional properties (Arendt et al., 2007).

Lactic acid bacteria (LAB) and yeast are the main microflora that dominate mature sourdough (Vogel et al., 1996), and their biological activity mainly occurs during fermentation. The catabolism of

amino acids by LAB has implications for the sensory properties of sourdough baked products. For instance, catabolic reactions such as deamination, decarboxylation, transamination and side chain modification of amino acids may produce ketoacids, ammonia, biogenic amines, aldehydes, organic acids and alcohols, which are essential to the flavor and nutritional quality of baked goods (Di Cagno et al., 2002). However, these microbial communities may also unavoidably lead to considerable accumulation of other toxic biogenic amines, especially tryptamine, cadaverine and putrescine. Landete et al. (2007) considered that lactic acid bacteria, which characterize fermented foods, are responsible for at least histamine, tyramine and phenylethylamine production in wine.

Recent studies have shown that some lactic acid bacteria, as well as other microorganisms such as yeast fungi, can produce γ -aminobutyric acid (GABA). GABA has been shown to induce hypotension in animal models (Hayakawa et al., 2004), and in human intervention trials (Inue et al., 2003). Consequently, GABA is extensively used in pharmaceutical preparations and functional foods. Nevertheless, the main dietary component involved in raising blood pressure (BP) is salt, which is directly linked to cardiovascular risk. As salt is one of the key ingredients in bread, some authors have proposed reducing (Janssen and Koeman, 2010) and/or replacing it (Wyatt and Ronan, 1982), normally with potassium chloride, which maintains the

* Corresponding author. Nutrition and Food Science Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024508; fax: +34 934035931.

E-mail addresses: marinadiana@ub.edu, marinadiana28@gmail.com (M. Diana).

intensity of the saltiness. Bread surface color develops later in baking, at the same time as crust formation, and arises from chemical processes such as the Maillard reaction and caramelization. These processes result in browning of the reaction mixture and can lead to acrylamide formation. It has been shown that acrylamide formation happens especially during the heating process (>120 °C) and increases with cooking temperature and time (Zhang et al., 2009). Foods with a high acrylamide concentration include French fries, chips, bread crust, cereal and baked goods. Since 1994, acrylamide has been considered a health risk and is classified by the International Agency for Research on Cancer as 'probably carcinogenic' to humans (IARC, 1994). For this reason, acrylamide content in bakery products is of research interest.

The aim of this study was to characterize three groups of breads: eleven commercial breads purchased at supermarkets, twelve artisan breads containing sourdough from artisan bakeries, and one experimental bread rich in GABA. The comparison was based on the content of free amino acids, including GABA and ornithine, as well as biogenic amine and acrylamide levels. Experimental sourdough bread was manufactured using a previously isolated (from Spanish cheese) and selected lactic acid strain with proven high GABA-producing ability. The experimental bread was made to evaluate the beneficial health effects of salt reduction and GABA enrichment, which are associated with a decrease in blood pressure.

2. Materials and methods

2.1. Flour and breads

Whole wheat flour, white wheat flour and roasted soybean flour were purchased from Harinas Polo (Zaragoza, Spain). Protease enzyme (Premix 091-B) was from Puratos S.A. (Groot-Bijgaarden, Belgium). A total of 11 commercial breads (samples CB1–CB11) and 12 artisan breads made with sourdough (samples AB1–AB12) were purchased from supermarkets and artisan bakeries, respectively, in Barcelona (Spain). Commercial breads were acquired from conventional supermarkets and, hence, were assumed to be yeast-leavened and fermented. In contrast, artisan breads were bought from artisan bakeries in which we were informed about sourdough use in the bread making. The experimental bread was made at pilot-plant scale. All of the samples were crusty breads. Each loaf of bread was grated on a laboratory knife mill (Grandmix GM 200) at 7000 rpm for 10 s and stored in a freezer until analysis.

2.2. Sourdough fermentation and the baking process in experimental bread

Lactobacillus brevis CECT 8183 previously isolated from an artisan Spanish cheese and with high proven capacity for GABA synthesis (Diana et al., 2013) was used as a starter for the sourdough fermentation. Four cryobeads of *L. brevis* CECT 8183 were cultivated on Man, Rogosa and Sharpe broth medium (MRSb) (AES Chemunex, Terrassa, Spain). After 48 h at 30 °C of incubation, the cells were recovered by centrifugation (10,000× g for 15 min), washed twice in sterile water, and re-suspended in a 10 μM pyridoxal 5-phosphate solution at the minimum cell density of log 8 CFU/ml. Whole wheat flour (16.5%), soya flour (2%), protease (1.5%) and distilled water (80%) were used to prepare 5000 ml of sourdough (the dough yield was 500) with a continuous speed mixer (100 rpm) in a bioreactor (Biostat A plus, Sartorius, Germany) that was previously sterilized at 121 °C for 20 min. Sourdough fermentation was carried out at 30 °C for 48 h. In order to enhance GABA production, pH was maintained at 4.5 by the continuous addition of 2.5 M KHCO. The grams of K⁺ in the total volume were used to replace sodium chloride in the final bread recipe. At the end

of fermentation, protease was deactivated by increasing the temperature to 70 °C for 2 min.

After filtration, the fermented sourdough (21%), refined wheat flour (60%), water (16.8%), common salt (0.78%) and citrate (0.13%) were used as ingredients to make bread. Baker's yeast (0.94%, w/w) and an improver (0.25%, w/w) were added to the bread recipe. The dough was fermented at 27 °C for 90 min with a humidity level of 76%. Baking was carried out at 205 °C for 25 min. Sourdough fermentations were carried out ten times and analyzed in duplicate to check the GABA content. Thereafter, the baked bread was analyzed twice.

2.3. Determination of pH and total titratable acidity (TTA), free amino acids (FAA), biogenic amines (BA) and acrylamide in breads

The TTA and pH values of breads were determined in 10 g of bread sample, which were homogenized with 90 ml of distilled water. TTA was expressed as the amount (ml) of 0.1 M NaOH to achieve a pH of 8.4.

The FAA concentration in the sourdough was determined by direct centrifugation to remove solids (20,000× g at 4 °C for 10 min) and filtration on 0.45 μm filters. The extraction of free amino acids from breads consisted of mechanical shaking of 1.5 g of the bread sample with 10 ml of 0.1 M hydrochloric acid containing 800 μL of 2.5 mM norleucine as internal standard. The sample was then centrifuged at 20,000× g at 4 °C for 10 min, and the supernatant was filtered through a 0.45 μm filter. Total and individual free amino acids, including GABA, were determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and UV detection after pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent from Waters (Cerdanyola del Vallès, Spain). Chromatographic separation was carried out in a Waters AccQ.Tag amino acid analysis Nova-Pak™ column (3.9 mm × 150 mm, 4 μm), fitted with a Nova-Pak™ C₁₈ Sentry™ Guard column (3.9 mm × 20 mm, 4 μm).

The BA in bread samples were determined by extraction with 10% trichloroacetic acid followed by pH adjustment before pre-derivatization with ortho-phthalaldehyde (OPA). BA was then analyzed by HPLC fluorescence detection.

The acrylamide content in the samples was analyzed following the methodology proposed by Waters Corporation (Waters Corporation, 2002) and detected by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). A triple quadrupole mass analyzer (Water Micromass Quattro micro) was used to enhance the sensitivity and specificity of the methodology.

2.4. Statistical analysis

The statistical evaluation of numerical variables was performed using a conventional *t*-test. In the case of non-normality, the Wilcoxon test was used. In the case of quantitative variables, Chi-square or Fisher test were used. Significant (*p* < 0.05) differences among the bread data were ranked using SAS Version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data were also analyzed with hierarchical cluster analysis to obtain a dendrogram.

3. Results

3.1. GABA content in experimental sourdough

The GABA concentration in sourdough prepared using *L. brevis* CECT 8183 after 48 h of fermentation in optimal conditions was 98.2 mg/100 ml (average of 10 batches analyzed individually). This value was very similar to that found by Coda et al., 2010 (103 mg/100 ml) in a study on the use of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* PU1 to enrich chickpea sourdough with gamma-aminobutyric acid.

After baking, a significant GABA level remained in the bread (24.2 mg/100 g) and GABA-enriched bread was obtained.

3.2. pH values, TTA, BA and acrylamide content

Table 1 shows the pH values, TTA, BA and acrylamide content in experimental bread and commercial and artisan breads. Commercial breads had pH values (5.65 ± 0.23) that were significantly ($p < 0.05$) higher and TTA values (1.76 ± 0.40 ml 0.1 M NaOH/10 g) that were significantly ($p < 0.05$) lower than artisan breads: 5.10 ± 0.59 and 3.16 ± 1.15 ml, respectively. Experimental bread had a low pH value (5.51) and a high TTA (2.35 ml 0.1 M NaOH/10 g).

All breads showed biogenic amine values below the limit of quantification (<10 ppm) for the six amines determined (histidine, putrescine, cadaverine, tyramine, tryptamine and 2-phenylethylamine), except for the experimental bread, which contained 41.8 mg/kg of tyramine.

Breads from supermarkets (CB) had values of acrylamide below the limit of quantification (10 µg/kg) (samples CB2–CB7) or values between 10 and 20 µg/kg (CB8–CB11). CB1 did not contain acrylamide. Experimental bread contained 33 µg/kg of acrylamide, which was below the highest content found in sourdough breads: 44 µg/kg, 124 µg/kg and 146 µg/kg in samples AB6, AB7 and AB11, respectively. Sourdough breads also had 20 µg/kg in samples AB1 and AB2 and 21 µg/kg in sample AB5. A concentration below 10 µg/kg was found in sample AB3 and 3 samples were found to have no acrylamide (AB8, AB9 and AB10). The acrylamide content in artisan breads was statistically ($p < 0.05$) higher than in supermarket breads.

3.3. Individual amino acid content and total FAA

Table 2 shows the 18 individual free amino acids in the three types of bread samples. Asp, Glu, Arg, Ala and GABA had the highest concentrations. The least abundant FAA in all bread samples were Met, Ile and Orn. For artisan breads, the mean value of total FAA was 61.0 ± 21.5 mg/100 g and for commercial breads it was 41.9 ± 11.4 mg/100 g. Experimental bread had the highest total FAA content (265.3 ± 8.6 mg/100 g) due to the high proteolytic activity of the sourdough.

We found significant ($p < 0.05$) differences for GABA, alanine, proline, leucine, phenylalanine and total amino acid content. Artisan breads values had significantly ($p < 0.05$) higher values than supermarket breads.

3.4. Hierarchical cluster analysis of bread samples

A dendrogram (Fig. 1) was created to display graphically the relatedness between the different samples. Experimental bread differed most from the rest of the breads, although it was directly linked with the sourdough bread samples. Therefore, sourdough breads matched supermarket breads, with less distance between them. Sample CB10 was placed among artisan sourdough bread samples, which indicates that the sample could contain sourdough even though it was purchased from a supermarket and was therefore assumed to have been yeast-leavened only. In contrast, samples AB2 and AB12 were situated among the CB group. These samples, which also showed low TTA and total FAA values (data not shown), may not contain sourdough even though they were purchased from artisan bakeries.

4. Discussion

The use of sourdough markedly influences the characteristics of bread. Artisan breads made with sourdough had the highest TTA values and the lowest pH value and contained the highest levels of free amino acids. As Bolourian et al. (2010) reported, the addition of sourdough to dough formulation resulted in a linear increase in the acidity of the product. Indeed, both lactic acid and acetic acid are important aromatic compounds and could intensify the effects of other aromatic elements (Bolourian et al., 2010). Artisan breads had lower pH values and higher TTA than supermarket breads, which are mainly fermented by yeast only. The lower pH and higher TTA found in sourdough breads are indicative of a lower rate of staling during storage (Barber et al., 1992). Our bread made with sourdough produced by *L. brevis* CECT 8183 had a low pH value (5.51) and a high TTA (2.35 ml 0.1 M NaOH/10 g). It had the highest free amino acid content (265 mg/100 g) ever found, to our knowledge.

Some studies have already been published on GABA-producing LAB strains from different food products, for instance, 177 mg/kg in cheese (Nomura et al., 1998) or 250 mM in kimchi (Cho et al., 2007). Although GABA-producing ability varies widely among the strains of LAB, some GABA-producing strains have shown great potential in large-scale fermentation for GABA production (Coda et al., 2010). In this study, we utilized a *L. brevis* strain previously isolated from an artisan Spanish cheese to prepare an optimized sourdough enriched in GABA (98.2 mg/100 ml), and thus a final baked good with higher GABA levels (24.2 mg/100 g) than the rest of the breads analyzed from commercial markets and bakeries. The GABA content found in a wholemeal wheat sourdough with a pool of ten lactobacilli and a *Lc. Lactis subsp. lactis* PU15 added was

Table 1

Parameters of acidification (pH and TTA), acrylamide and biogenic amine (BA) (histamine, cadaverine, putrescine, tyramine, tryptamine and 2-phenylethylamine) content for the experimental bread, breads without sourdough (CB) and sourdough breads (AB). Ranged values for acidification parameters are also included.

	Experimental bread ^a (n = 1)	CB* (n = 11)	AB* (n = 12)	P value CB vs AB ^d
pH	5.51	5.65 ± 0.23 (5.22–6.14)	5.10 ± 0.59 (4.08–5.78)	0.012
TTA (ml 0.1 M NaOH/10 g)	2.35	1.76 ± 0.40 (1.20–2.43)	3.16 ± 1.15 (1.30–5.10)	0.0023
Acrylamide ^b (µg/Kg)	0	1 (9.1%)	3 (30.0%)	0.0007
	<10	6 (54.5%)	1 (10.0%)	
	10–20	4 (36.4%)	0	
	≥20	1 (100%) ^e	0	
Biogenic amines ^c (mg/Kg)	41.8 (TY)	<10	<10	

* Values are the mean \pm standard deviation of all samples (Ranged values).

^a Data are the mean of the individual sample twice analyzed.

^b Descriptive category: data are grouped in four categories depending on the range of values found. Values are the number of samples (n) and the percentage of the category, respectively.

^c Includes His, Ca, Pu, Ty, Try and 2-Phe. All samples had values below 10 ppm (LQ) for every BA, except the experimental bread, in which every amine was <10 of the rest of the samples, but 41.8 ppm for tyramine.

^d Values differ significantly ($P < 0.05$).

^e 33 µg/kg.

Table 2
Individual amino acid content (mg/100 g) determined in the experimental bread, in breads without sourdough (CB) and the sourdough breads (AB).

	Experimental bread ^a	CB ^b (n = 11)	CB range	AB ^b (n = 12)	AB range
γ-aminobutyric acid (GABA)	24.21	2.84 ± 0.70*	1.57–3.95	5.27 ± 2.00*	2.01–8.84
Ornithine	16.58	0.76 ± 0.32	0.38–1.44	0.51 ± 0.34	0.01–1.06
Aspartic acid	21.51	8.11 ± 3.47	1.13–14.41	10.89 ± 3.49	6.02–17.09
Serine + Asparagine	13.77	2.24 ± 1.29	0.84–3.90	4.99 ± 4.16	0.29–14.25
Glutamic acid	13.37	6.28 ± 1.99	3.68–9.98	8.06 ± 3.19	3.69–14.52
Glycine	7.67	2.01 ± 0.50	1.35–3.25	1.95 ± 0.95	0.41–3.02
Hystidine + Glutamine	36.79	2.00 ± 0.71	1.20–3.25	2.07 ± 1.72	0.39–5.71
Arginine	5.01	5.27 ± 2.44	2.57–11.68	7.48 ± 2.97	2.59–11.90
Threonine	6.52	0.87 ± 0.45	0.00–1.56	1.29 ± 0.66	0.40–2.29
Alanine	15.65	3.52 ± 1.97*	0.80–7.01	6.34 ± 2.60*	2.55–9.86
Proline	20.73	2.02 ± 0.55*	1.49–3.13	3.72 ± 1.84*	1.10–7.91
Tyrosine	2.80	1.30 ± 0.40	0.58–2.13	1.61 ± 0.58	0.78–2.66
Valine	15.17	1.44 ± 0.86	0.40–3.35	2.00 ± 1.17	0.41–4.29
Lysine	8.63	1.42 ± 0.50	0.77–2.47	1.72 ± 1.34	0.35–4.37
Isoleucine	11.51	0.53 ± 0.41	0.00–1.54	0.73 ± 0.55	0.00–1.82
Leucine	24.54	0.79 ± 0.94*	0.00–3.44	1.38 ± 1.05*	0.00–3.78
Phenylalanine	16.07	0.52 ± 0.76*	0.00–2.41	1.21 ± 0.79*	0.00–2.32
Metionine	4.77	0.03 ± 0.08	0.00–0.29	0.12 ± 0.25	0.00–0.76
Total FAA	265.33	41.94 ± 11.43*	0.00–14.41	61.00 ± 21.49*	0.00–17.09

* Values differ significantly ($P < 0.05$). In all cases AB showed statistically ($p < 0.05$) higher values than CB.

^a Data are mean of individual sample twice analyzed.

^b Values are data mean ± standard deviation of all samples.

259 ppm (Rizzello et al., 2008) which was the highest of different sourdough formulas. However, Coda et al. (2010) found 1031 ppm in a cheakpea sourdough with *Lc. lactis subsp. lactis* PU1 as the only strain added. In this study we showed the maximum GABA concentrations achieved in a wholemeal wheat sourdough model (982 ppm) with only one lactic acid bacteria as the main GABA-producer and in the final baked bread (240 ppm). A recent study (Lamberts et al., 2012) also showed high GABA levels reached after sourdough wheat flour fermentation (300 ppm) that were largely

reduced after baking (120–150 ppm). As Lamberts et al. (2012) reported, GABA levels decrease during fermentation due to amino acid consumption by the yeast, which further decreases during proofing and baking.

A daily intake of 100 ml fermented milk containing between 10 and 12 mg of GABA for 12 weeks has been shown to reduce blood pressure in hypertensive patients (Inue et al., 2003). The results of the present study suggest that experimental GABA-enriched bread (24.2 mg/100 g) could have an effect on blood pressure since, in a

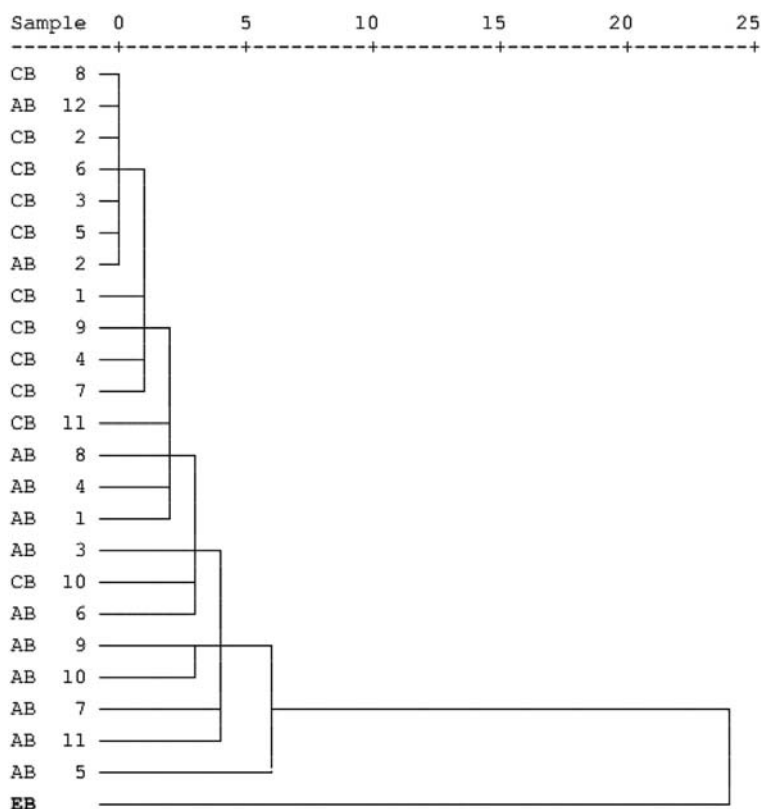


Fig. 1. Hierarchical cluster analysis for commercial breads (CB1–CB11), artisan breads (AB1–AB12) and experimental bread (EB).

recent study performed by Pouliot Mathieu et al. (2013) a concentration of 16 mg GABA was associated with a reduction of 3.5 ± 2.8 mmHg in mean blood pressure and 5.5 ± 3.9 mmHg for systolic pressure in individuals who ate 50 g of experimental cheese. This is particularly relevant, as the daily home consumption of bread in Spain is 99 g per person (MAGRAMA, 2013), which means that the intake of our experimental bread could induce hypotension. However, there are not many publications referring to ornithine as a bioactive component, although several authors have reported the beneficial effects of this amino acid. Sugino et al. (2008) demonstrated that ornithine has an antifatigue effect and is frequently used as a supplement, since it increases muscle synthesis and accelerates basal metabolism. It has been shown to have an esthetic effect on skin by reducing wrinkles (Shi et al., 2002) and it also leads to improvements in immunity (Robinson et al., 1999). Although the body can produce its own supply, this study showed that the experimental bread could be a good source of ornithine (16.6 mg/100 g) as it was one of the most abundant amino acids in the bread.

In general, a considerable increase in amino acid levels was observed during the sourdough fermentation. As the results showed, experimental bread had the highest amino acid content (265 mg/100 g), followed by breads with sourdough addition (average 61.0 mg/100 g). The lowest total amino acid content was found in commercial breads (average 41.94 mg/100 g). This might be explained by the consumption of free amino acid in dough fermented only by yeast (if we assume that commercial breads are yeast-leavened), which consumes amino acids during growth. In contrast, the amino acid concentrations resulting from lactic acid fermentations remain unchanged or are higher. Our results show the important role of LAB in the experimental sourdough and the final bread, since the release of free amino acid was higher than in the rest of the breads. The addition of a protease to the sourdough formula increased protein degradation. Despite this addition, another factor that limited proteolysis in dough was chemical acidification. In conclusion, the combination of *Lactobacilli* occurrence, chemical acidification, and protease addition led to extensive degradation of proteins.

LAB are also responsible for biogenic amine production, due to decarboxylating activities. Biogenic amine can accumulate as the result of uncontrolled microbial enzymatic activity and is a protective mechanism for bacteria against acidic environments. Tyramine was the only amine found in the study, and was only detected in experimental bread. Tyramine production might be explained by the capacity of *L. brevis* CECT 8183 to produce the amine from tyrosine decarboxylation. Since BA in food requires the presence of bacteria with the appropriate aminoacyl decarboxylase activity, we did not expect to find any occurrence of toxicological BA in commercial breads, which are normally yeast-leavened. The tyramine content in experimental bread might be due to the high *L. brevis* decarboxylase activity in the sourdough process. Other foods such as meat and particularly cheeses have the highest concentrations of tyramine, reaching over 1000 ppm in long-ripened cheeses (Fernández et al., 2007). The value of 41.8 mg/kg in experimental bread is higher than that found in vegetables (e.g. potato: 7 mg/kg) and fermented drinks (e.g. red wine: 18.2 mg/kg), but much lower than in fermented meat (e.g. Spanish meat ripened sausage: 282.4 mg/kg) or dairy products (e.g. ripened raw milk cheese: 453.8 mg/kg) (Ladero et al., 2010). In healthy men, an average of 500 mg of orally administered tyramine is required to increase systolic blood pressure by at least 30 mmHg, whilst women appear to be more sensitive (Ladero et al., 2010). As published by the European Food Safety Authority (EFSA, 2011), a range from 600 mg up to 2000 mg of tyramine administered in a meal would be needed to cause a minimal increase in systolic blood pressure (of at least

30 mmHg). With this information, we can conclude that the amount of tyramine found in the experimental bread was too low to have any toxicological effect, particularly, any effect that counteracts the lowering of blood pressure by GABA.

Acrylamide is known to be carcinogenic in rodents and is classified by the International Agency for Research on Cancer as probably carcinogenic to humans (IARC, 1994). In this study, artisan breads with sourdough had higher acrylamide levels than commercial breads. The increase in acrylamide in artisan breads might be explained by the toasting time, since supermarket breads are less toasted than breads made with sourdough. Several authors have stated that toasting time increases acrylamide significantly (Becalski et al., 2003; Konings et al., 2003). However, even if there is a high consumption of bread and hence the contribution of acrylamide could be relevant, the values obtained in this study were low (the maximum value was 146 µg/kg) compared with the indicative values for crusty breads (450 µg/kg) (European Commission, 2013).

5. Conclusions

Firstly, experimental sourdough bread contained a higher GABA and total FAA concentration than the commercial breads. The concentration was theoretically high enough to reduce blood pressure in standard intake conditions. Secondly, this study compared the amino acid content, biogenic amine and acrylamide levels in the two groups of breads: commercial breads (assumed to be yeast-leavened and fermented) and artisan sourdough breads. Sourdough breads contained statistically higher levels of amino acids and acrylamide than commercial breads. These findings may contribute to enhancing the health benefits of sourdough breads and to considering the potential of *L. brevis* as a LAB starter in sourdoughs for the production of GABA-enriched breads. Clinical evidence is required to ensure the GABA hypotensor effect in the experimental bread.

Acknowledgments

This research was supported by Europastry S.A., Sant Cugat Del Vallès, Barcelona, Spain (Center for Industrial Technological Development IDI-20110755). We thank Chiara Giannola and Cristina Arco for their kind collaboration in the analysis.

References

- Arendt, E.K., Liam, A.M., Ryan, Dal Bello, F., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol.* 24, 165–174.
- Barber, B., Ortolá, C., Barber, S., Fernández, F., 1992. Storage of packaged white bread. III. Effects of sourdough and addition of acids on bread characteristics. *Z. Lebensm. Forsch.* 194, 442–449.
- Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D., Seaman, S.W., 2003. Acrylamide in foods: occurrence, sources and modeling. *J. Agric. Food Chem.* 51, 802–808.
- Bolourian, S., Khodaparast, M.H.H., Movahhed, G.G., Afshary, M., 2010. Effect of lactic acid fermentation (*Lactobacillus plantarum*) on physicochemical flavor, staling and crust properties of semi volume bread (*Baguette*). *World Appl. Sci. J.* 8, 101–106.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Gobbetti, M., 2010. Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *Int. J. Food Microbiol.* 137, 236–245.
- Cho, Y.R., Chang, J.Y., Chang, H.C., 2007. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from Kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 104–109.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M., Gobbetti, M., 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 623–633.
- Diana, M., Tres, A., Quílez, J., Llombart, M., Rafecas, M., 2013. Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. *J. Food Sci. Technol.* 56, 351–355.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Biogenic amines in fermented foods. *EFSA J.* 9 (10), 2393.

- European Commission, 2013. Commission recommendation of 8 November 2013 concerning the investigation of acrylamide levels in food. Off. J. Eur. Union 301, 15–17, 2013/647/UE.
- Fernández, M., Linares, D.M., Rodríguez, A., Álvarez, M.A., 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA655. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 1400–1406.
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., Yamori, Y., 2004. Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. Br. J. Nutr. 92, 411–417.
- International Agency of Research on Cancer, 1994. Monograph 60 on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. IARC, Lyons.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hyakawa, K., Kimura, M., 2003. Blood pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. Eur. J. Clin. Nutr. 57, 490–495.
- Janssen, A.M., Koeman, F.T., 2010. Effect of stepwise reduction of salt content in bread on consumer's food choice during breakfast. In: Proc 4th European Conference on Sensory and Consumer Research. Vitoria (Spain). Available at: <http://elsevier.conference-services.net/resources/247/1894/pdf/SENS20100388>. PDF (accessed 11.10.11).
- Konings, E., Baars, A., van Klaveren, J., Spanjer, M., Rensen, P., Hiemstra, M., van Kooij, J., Peters, P., 2003. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. Food Chem. Toxicol. 41, 1569–1579.
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., Alvarez, M., 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. Curr. Nutr. Food Sci. 6 (2), 145–156.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. Food Control 18, 1569–1574.
- Lamberts, L., Joye, I., Beliën, T., Delcour, J., 2012. Dynamics of γ -aminobutyric acid in wheat flour bread making. Food Chem. 130, 896–901.
- MAGRAMA, 2013. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. www.magrama.gob.es.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukama, S., Suzuki, I., 1998. Production of γ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. J. Dairy Sci. 81, 1486–1491.
- Pouliot Mathieu, K., Gardner-Fortier, C., Lemieux, S., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Vuilleumard, J.-C., 2013. Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing acid lactic bacteria on blood pressure in men. Pharmnutr. 1, 1–8.
- Rizzello, C., Cassone, A., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2008. Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. J. Agric. Food Chem. 56, 6936–6943.
- Robinson, L.E., Bussier, F.I., Le Boucher, J., Farges, M.C., Cynober, L.A., Field, C.J., Baracos, V.E., 1999. Amino acid nutrition and immune function in tumour-bearing rats: a comparison of glutamine-, arginine- and ornithine 2-oxoglutarate-supplemented diets. Clin. Sci. 97, 657–669.
- Shi, H.P., Fishel, R.S., Efron, D.T., Williams, J.Z., Fishel, M.H., Barbul, A., 2002. Effect of supplemental ornithine on wound healing. J. Surg. Res. 106, 299–302.
- Suginio, T., Shirai, T., Kajimoto, Y., Kajimoto, O., 2008. L-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. Nutr. Res. 28, 738–743.
- Vogel, R.F., Muller, M., Stolz, P., Ehrmann, M., 1996. Ecology in sourdoughs produced by traditional and modern technologies. Adv. Food Sci. 18, 152–159.
- Wyatt, C.J., Ronan, K., 1982. Evaluation of potassium chloride as a salt substitute in bread. J. Food Sci. 47, 672–673.
- Zhang, Q., Ames, J., Smith, R., Baynes, J., Metz, T., 2009. A perspective on the maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. J. Proteome Res. 8, 754–769.

4.4 *Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review*

Marina Diana, Joan Quílez & Magdalena Rafecas

Journal of Functional Food (2014), 10, 407-420

Índice de impacto (2014): 4,48

Categoría: Food Science and Technology, 5 de 123 (1^{er} cuartil)

Resumen:

Esta revisión recoge los beneficios saludables comprobados del GABA, así como su síntesis natural por la acción microbiana y las técnicas para su optimización y producción. Una de las funciones fisiológicas más importantes es su efecto hipotensor, comprobado tanto en animales como en ensayos clínicos humanos lo cual abre interesantes expectativas para la obtención de alimentos funcionales que puedan ayudar en la regulación de la presión arterial. Las bacterias ácido lácticas son los principales productores de GABA y por tanto existe una amplia variedad de alimentos fermentados enriquecidos en este aminoácido. La biosíntesis del GABA y su optimización, sin afectar a las características organolépticas, son la clave para la obtención de alimentos enriquecidos que puedan tener beneficios saludables. Un mayor conocimiento en los componentes bioactivos de los alimentos abre nuevas vías en el mundo de la alimentación sana, probiótica y funcional.

Available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review

Marina Diana ^{a,b,*}, Joan Quílez ^{b,c,d}, Magdalena Rafecas ^a

^a Nutrition and Food Science Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

^b Technology Department, Europastry, S.A., Spain

^c Human Nutrition Unit, School of Medicine, IISSPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

^d CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2014

Received in revised form 3 July 2014

Accepted 7 July 2014

Available online

Keywords:

Gamma-aminobutyric acid

Lactic acid bacteria

GABA-enriched food products

Bioactive compound

ABSTRACT

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid, considered a potent bioactive compound. GABA has been widely studied because of its numerous physiological functions and positive effects on many metabolic disorders. One the most important of these is the hypotensive effect that has been demonstrated in animals and in human intervention trials. The biosynthesis of GABA and its optimization, without affecting sensory characteristics, are the key in obtaining GABA-enriched food products that have health benefits. Lactic acid bacteria (LAB) are the main GABA-producers and therefore there are a wide range of GABA-enriched fermented food products, in which GABA is natural, safe and eco-friendly. Increasing knowledge of bioactive components in food has opened avenues for the development of new, naturally occurring functional food with added value for health.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Although GABA has been widely studied in medical and pharmaceutical fields, this article focuses on enhanced GABA levels in food products, its biosynthesis and physiological function, mainly when it is consumed, its optimization, and future beneficial effects in the food industry.

GABA is a four-carbon free amino acid that is widely present in bacteria, plants and vertebrates. In plants and bacteria it plays a metabolic role in the Krebs cycle, and in vertebrates it acts as a potent neural signal transmitter. GABA is primarily formed by the irreversible α -decarboxylation reaction of L-glutamic acid or its salts, catalysed by glutamic acid decarboxylase enzyme (GAD; EC 4.1.1.15) (Fig. 1) (Satya Narayan & Nair, 1990) whose biochemical properties have been characterized (Nomura, Nakajima, Fujita, & Kobayashi, 1999). This enzyme has been

found in bacteria such as LAB (Bertoldi, Carbone, & Borri-Voltattorni, 1999), *Escherichia* (Rice, Johnson, Dunnigan, & Reasoner, 1993), *Streptococcus*, *Aspergillus* (Kato, Furukawa, & Hara, 2002) and *Neurospora* (Kubicek, Hampel, & Rohr, 1979); in plants such as tea (Zhao et al., 2011), tomato (Yoshimura et al., 2010), soybean (Serraj et al., 1998), mulberry leaf (Yang, Jhou, & Tseng, 2012), germinated brown rice (Dai-xin, Lu, Lan, Li-te, & Yong-Qiang, 2008) and petunia (Johnson, Narendra, Joe, Cherry, & Robert, 1997); and in mammalian animal brain (Nathan et al., 1994). GABA is also found in insects such as cockroach, grasshopper, moth, honeybee and fly (Anthony, Harrison, & Sattelle, 1993). However, studies have mostly focused on GABA-producing microorganisms rather than GABA in isolation. LAB (Maras, Sweeney, Barra, Bossa, & John, 1992) and yeast (Hao & Schmit, 1993) are the most important GABA producers, because they are commercially useful as starters in fermented foods.

* Corresponding author. Tel.: +34 934024508; fax: +34 934035931.

E-mail address: marinadiana@ub.edu (M. Diana).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.004>

1756-4646/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

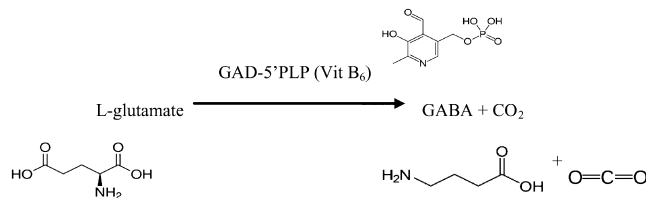


Fig. 1 – Decarboxylation reaction of L-glutamate to GABA catalysed by glutamate decarboxylase (GAD), which is dependent on the cofactor pyridoxal-5'-phosphate or vitamin B₆.

1.1. Physiological functions

There is considerable knowledge about the multiple physiological functions of GABA. As a result, the development of functional foods containing GABA has been actively pursued (Saikusa, Horino, & Mori, 1994). In animals, GABA is found at high concentrations in the brain and plays a fundamental role in inhibitory neurotransmission in several of its routes within the central nervous system, and also in peripheral tissues (DeFeudis, 1981). Alterations in GABAergic circuits are associated with Huntington's disease, Parkinson's disease, senile dementia, seizures, Alzheimer's disease, stiff person syndrome and schizophrenia (Wong, Bottiglieri, & Snead, 2003), because the GAD substrate (L-glutamate) acts as an excitant of human neurons and its product (GABA) acts as an inhibitor (Battaglioli, Liu, & Martin, 2003). One alteration can be caused by very low GABA content in the brain, which is observed in patients with Alzheimer's disease (Seidl, Cairns, Singewald, Kaehler, & Lubec, 2001). Okada et al. (2000) demonstrated that a daily oral administration of rice germ containing 26.4 mg GABA was effective in treating these neurological disorders. Indeed, the practice of yoga *asana* sessions increases GABA levels in the brain, and is a potential treatment for some autonomic disorders that are commonly observed in menopausal and presenium periods (Streeter et al., 2007).

Other physiological functions such as relaxation (Wong et al., 2003), sleeplessness and depression (Okada et al., 2000) have been treated with GABA. Very recently, Wu et al. (2014) showed the GABA content in a variety of tea and demonstrated the sleep-promoting effect of GABA. This bioactive compound could potentially protect against chronic kidney disease, ameliorate oxidative stress induced by nephrectomy (Sasaki et al., 2006), and activate liver and kidney function (Sun, 2004). GABA has been shown to naturally enhance immunity under stress conditions within one hour of its administration in humans (Abdou et al., 2006). GABA may also be useful for alcohol-related disease prevention and treatment (Oh, Soh, & Cha, 2003b). Furthermore, this amino acid contributes to increasing the concentration of growth hormone in plasma and the rate of protein synthesis in the brain (Tujioka et al., 2009). Recent studies also indicate that it is a potent secretor of insulin, and thus could help to prevent diabetes (Adeghate & Ponery, 2002). Other authors suggested that GABA tea ameliorates diabetic-induced cerebral autophagy and therefore may possess the potential on the therapy of diabetic encephalopathy (Huang et al., 2014).

GABA could delay or inhibit the invasion and metastasis of various types of cancer cells, such as mammary gland, colon and hepatic cancer cells (Kleinrok, Matuszek, Jesipowicz, Opolski, & Radzikowski, 1998; Minuk, 2000; Opolski, Mazurkiewicz, Wietrzyk, Kleinrok, & Radzikowski, 2000). Furthermore, consumption of GABA-enhanced brown rice can inhibit leukaemia cell proliferation and has a stimulatory action on cancer cell apoptosis (Oh & Oh, 2004). GABA has also been considered a potential tumour suppressor for small, airway-derived lung adenocarcinoma (Schuller, Al-Wadei, & Majidi, 2008). In addition, it has anti-inflammatory and fibroblast cell proliferation activities, which promote the healing of cutaneous wounds (Han, Kim, Lee, Shim, & Hahm, 2007). Besides, this amino acid is involved in maintaining cell volume homeostasis under UV radiation (Warskulat, Reinen, Grether-Beck, Krutmann, & Häussinger, 2004), in the synthesis of hyaluronic acid, and in enhancing the rate of dermal fibroblasts exposed to oxidative stress agents (Ito, Tanaka, Nishibe, Hasegawa, & Ueno, 2007), which makes GABA a potential novel application for dermatological purposes (Di Cagno et al., 2009). Kelly and Saravanan (2008) reported that GABA may reduce inflammation in rheumatoid arthritis and attenuate the metabolic response to ischemic incidents (Abel & McCandless, 1992). It also affects the control of asthma (Xu & Xia, 1999) and breathing (Kazemi & Hoop, 1991).

Several reports have referred to the link between GABA and mood disorders. Low GABA in plasma may be a biological marker of vulnerability to the development of various mood disorders. As Petty (1994) showed, plasma concentrations of GABA were significantly lower than control values in patients with major bipolar disorder and manic-depressive illness. Krystal et al. (2002) demonstrated that normal GABA levels may reflect effective antidepressant treatments and seizure control, and are a target for the treatment of bipolar disorder. Moreover, plasma GABA levels may correlate with aggressiveness in some patients with depression, mania and alcoholism (Bjork et al., 2001). There is a relationship between progesterone, GABA, and mood behaviour in women (Rapkin, 1999). Hormone secretion may also be regulated by GABA, as shown by Parkash and Kaur (2007). Furthermore, there is clinical evidence of the regulation of thyroid hormones and GABA systems. Thyroid dysfunction (i.e. hyperthyroidism or hypothyroidism) acts on the GABA system. It particularly affects enzyme activities that are responsible for the synthesis and degradation of GABA and GABA receptor expression and function. In the developing brain, hypothyroidism generally decreases enzyme activities and GABA levels, whereas in the adult brain, hypothyroidism tends to increase enzyme activities and GABA levels (Wiens & Trudeau, 2006). Furthermore, recently, Xie, Xia and Le (2014) demonstrated that GABA improves oxidative stress and functions of thyroids and thyroid hormones explaining lowered weight gains and suggesting GABA as a preventer of obesity. Other authors demonstrated GABA as a bioactive compound present in brown rice and germinated brown rice may mediate anti-obesity effects through the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene (Imam et al., 2014). Other studies have suggested that GABA could improve visual function in senescent animals (Leventhal, Wang, Pu, Zhou, & Ma, 2003) and even enhance memory (Kayahara & Sugiura, 2001). Finally, there is evidence of GABA acting as a signal between cell-to-cell

Table 1 – Physiological functions of GABA tested on animals and humans.

Physiological function	Specific function	Reference
Neurotransmission	Inhibitory neurotransmitter	Battaglioli et al., 2003; DeFeudis, 1981
Blood pressure regulator	Potent hypotensive agent	Abe et al., 1995; Aoki et al., 2003; Hayakawa et al., 2004; Inoue et al., 2003; Joye et al., 2011; Kajimoto et al., 2004; Matsubara et al., 2002; Noguchi et al., 2007; Pouliot-Mathieu et al., 2013; Sasaki et al., 1996; Shimada et al., 2009; Tsai et al., 2013; Yamakoshi et al., 2007; Yang et al., 2012; Yoshimura et al., 2010; Wang et al., 2010; Watanabe et al., 2003
Brain diseases	Action on neurological disorders	Okada et al., 2000; Seidl et al., 2001; Wong et al., 2003; Streeter et al., 2007
Psychiatric diseases	Enhances memory Action on mood disorders Relaxing effect Action on sleeplessness Antidepressant	Kayahara & Sugiura, 2001 Bjork et al., 2001; Krystal et al., 2002 Wong et al., 2003 Okada et al., 2000 Krystal et al., 2002; Okada et al., 2000
Vital organs	Prevention and treatment of alcoholism Action on chronic kidney disease Activates liver function Improves visual function Increases rate secretion protein in brain	Bjork et al., 2001; Oh et al., 2003a Sasaky et al., 2006; Sun, 2004 Sun, 2004 Leventhal et al., 2003 Tujioka et al., 2009
Immune system	Enhances immunity	Abdou et al., 2006
Protective against cancer	Delays and/or inhibits cancer cells proliferation Stimulatory action on cancer cells apoptosis Potent tumour suppressor	Kleinrok et al., 1998; Minuk, 2000; Opolski et al., 2000 Oh & Oh, 2004 Schuller et al., 2008
Cell regulator	Keeps cell volume homeostasis Anti-inflammation and fibroblast cell proliferation Synthesis of hyaluronic acid Enhances the rate of dermal fibroblasts Quorum sensing signal cell-to-cell	Warskulat et al., 2004 Han et al., 2007 Ito et al., 2007 Ito et al., 2007 Chevrot et al., 2006
Protector of CVD	Reduces inflammation in rheumatoid arthritis Attenuates the metabolic response to ischemic incidence	Kelly & Saravanan, 2008 Abel & McCandless, 1992
Respiratory diseases	Preventer of obesity Control in asthma Control on breathing	Imam et al., 2014 Xu & Xia, 1999 Kazemi & Hoop, 1991
Hormonal regulator	Increases growth hormone Regulation of hormone secretion Regulation of progesterone Regulation of thyroid hormone Potent secretor of insulin Preventer of obesity	Tujioka et al., 2009 Parkash & Kaur, 2007 Rapkin, 1999 Wiens & Trudeau, 2006 Adeghate et al., 2002 Xie et al., 2014

eukaryotes and pathogenic bacteria controlling the level of quorum-sensing signal cells (Chevrot et al., 2006).

All these physiological functions (data are summarized in Table 1) mean that GABA enriched foods are the natural way to obtain food products with any or low cost added in the production. Chemical addition increase significantly the product price. The products can be available if they pass the food normative. There are a vast variety of GABA-enhanced food products, including: cereals, sourdough and breads, cheeses, fermented sausages, teas, vegetables, legumes, dairy and soy products, alcohol beverages and traditional Asian fermented food.

1.1.1. GABA as a potent hypotensive agent

Blood pressure regulation is the most important effect of GABA. Numerous studies have shown that GABA can reduce high blood pressure in animals and humans. Table 2 shows some of the tests that have demonstrated the hypotensive effect of GABA.

The blood pressure (BP) in spontaneously hypertensive rats (SHR) and in hypertensive humans decreases in response to the consumption of GABA-rich food, as shown by Hayakawa et al. (2004) and Kajimoto et al. (2004), respectively. Arterial pressure and heart rate were reduced by direct injection of GABA (50–200 µg) in Wistar rats (Sasaki et al., 1996). Systolic blood pressure (SBP) in SHR was notably reduced after 8 weeks of oral administration of GABA and peptide-enriched soymilk drink (Liu et al., 2011). Moreover, a rat fed a GABA-enriched soy sauce diet for 6 weeks also showed a decrease in SBP (Yamakoshi et al., 2007). Another GABA-enriched fermented soybean diet was efficient in the reduction of BP in SHR (Aoki et al., 2003). The effect of GABA-enriched soybean powder on lowering BP in SHR was also reported by Shizuka et al., 2004. Furthermore, Abe et al. (1995) reported that green tea rich in GABA decreased BP in young and old salt-sensitive rats. In addition, mulberry leaf extract containing GABA lowered blood pressure in SHR in a dose-dependent manner (Yang et al., 2012),

Table 2 – Some tests of GABA as hypotensor agent.

Intake matrix	GABA dosage	Type of animal	Reference
Fermented milk	0.5 mg	Rat	Hayakawa et al., 2004
Direct injection	50–200 µg	Rat	Sasaki et al., 1996
Soy milk drink	1.36 mg/kg BW/day	Rat	Liu et al., 2011
Soy sauce	0.33 ml/kg BW (containing 1% of GABA)	Rat	Yamakoshi et al., 2007
Tempeh-like fermented soybean	nr	Rat	Aoki et al., 2003
Soybean powder	0.15%	Male rat	Shizuka et al., 2004
Green tea	4 mg	Rat	Abe et al., 1995
Mulberry leaf aqueous extract	2–20 mg/kg BW	Male rat	Yang et al., 2012
Potato snack	1.7 mg/kg BW	Rat	Noguchi et al., 2007
Purple sweet potato fermented milk	60 µg–600 µg GABA/ml	Rat	Tsai et al., 2013
Fermented milk	nr	Human	Kajimoto et al., 2004
Fermented milk	100 ml (containing 10–12 mg of GABA)	Human	Inoue et al., 2003
Cheese	50 g (containing 16 mg of GABA)	Human	Pouliot-Mathieu et al., 2013
Tomato	2 and 10 g tomato/kg BW (containing 180% of GABA)	Rat	Yoshimura et al., 2010
Algae	20 mg	Human	Shimada et al., 2009
Mushroom (<i>Agaricus blazei</i>)	nr	Human	Watanabe et al., 2003
Dietary supplementation	80 mg	Human	Matsubara et al., 2002
Breakfast cereals	30 g (containing 66 ppm)	Human	Joye et al., 2011
Fermented vinegar and dried bonito drinking water	70 mg GABA	Human	Tanaka et al., 2009

SHR, spontaneously hypertensive rats; nr, not reported; BW, body weight.

and a red algae extract (*Porphyra*) significantly lowered BP in the same kind of rats (Umekawa et al., 2008). A single administration of GABA-enriched potato snack (1.7 mg/kg BW) reduced blood pressure in a dose-dependent way in rats with normal blood pressure (Noguchi, Nakamura, Nagai, Katsuda, & Koga, 2007), and a recent article reported that a dose of purple sweet potato fermented milk had an antihypertensive effect in SHR (Tsai, Chiu, Ho, Lin, & Wu, 2013).

In human intervention trials, daily intake for 12 weeks of 100 ml of fermented milk containing between 10 and 12 mg of GABA reduced BP in hypertensive patients (Inoue et al., 2003). Moreover, 50 g of GABA-enriched cheese (containing 16 mg of GABA) lowered SBP by 5.5 ± 3.9 mmHg in men (Pouliot-Mathieu et al., 2013). In a single administration study, treatment with a GABA-enriched tomato cultivar elicited a significant decrease in SBP compared to the control group (Yoshimura et al., 2010). The antihypertensive effect in humans has also been studied with an algae enriched with GABA, which reduced BP after oral administration (20 mg of GABA) for 12 weeks. Therefore, its use as a dietary supplement has been proposed (Shimada et al., 2009). Moreover, a mushroom species (*Agaricus blazei*) with enhanced levels of GABA had an antihypertensive effect on mild hypertensive human subjects (Watanabe et al., 2003). Dietary supplementation of 80 mg of GABA also reduced BP in adults with mild hypertension (Matsubara et al., 2002). Other authors suggested that the daily consumption of one portion (30 g) of GABA-enriched breakfast cereals lowered BP (ca. 10 mg) (Joye, Lamberts, Brijs, & Delcour, 2011).

1.2. Mechanism underlying GABA effects in human health

GABA, which is synthesized in the brain, works by blocking brain signals (neurotransmissions). Factors such as guidance of pre-

and postsynaptic neurons as well as receptor development and localization are necessary for the correct establishment and function of synapses. Approximately 60–75% of all synapses in the central nervous system are GABAergic (Schwartz, 1988). GABA has a pronounced effect on these events and elicits differentiation of neurons; that is, GABA acts as a trophic signal. Accordingly, activating pre-existing GABA receptors, a trophic GABA signal enhances the growth rate of neuronal processes, facilitates synapse formation, and promotes synthesis of specific proteins. Transcription and the novo synthesis are initiated by the GABA signal, but the intracellular link between GABA receptor activation and DNA transcription is largely unknown. The GABA receptors, which recognize and bind GABA, are located in the postsynaptic membrane and are categorized into three major groups: A or alpha, B or beta and C or gamma (with subunits that further determine its pharmacological activity). For example, a select number of benzodiazepines have a tendency to strongly bind with the alpha 1 subunit, while others bind to different alpha subunits. GABA-A receptors mediate fast inhibitory synaptic transmissions; they regulate neuronal excitability and rapid changes in mood. Thus, the seizure threshold, anxiety, panic and response to stress are regulated by GABA-A receptors (Borden, Murali Dhar, & Smith, 1994). GABA-B receptors mediate slow inhibitory transmissions, which appear to be important in memory, mood and pain (Meldrum & Chapman, 1999). GABA-C receptors have been identified, but their physiological role has not yet been described. Nevertheless, the blood–brain barrier is impermeable to GABA and its concentration in the brain is not changed following injection (Hayakawa et al., 2004). Thus, other effects seen following administration of GABA are due to its actions within the peripheral tissues (blood vessels or autonomic nervous system). GABA can inhibit the perivascular nerve stimulation-induced increase in perfusion pressure and also accompany-

ing noradrenaline release from sympathetic nerve fibres of the mesenteric arterial bed through an action on presynaptic GABA_B receptors (Hayakawa et al., 2002). Together with its neurological effects, GABA demonstrates effects on the endocrine system. However, most of the clinical applications of GABA are purely theoretical, based on word-of-mouth clinical experience or data extrapolated from drug studies. A large scale clinical study on a plethora of endocrine and psycho-neurological conditions is needed.

2. GABA production

In the last decade, natural ways to synthesize GABA have been proposed. Most are based on LAB GABA-producing ability, but other microorganisms such as fungi and other bacterial genera have also been used. In addition, GABA metabolism in plants has been studied, which may be another way to easily obtain the amino acid. Furthermore, marine-derived GABA is found to be a good source of functional food ingredients (Harnedy & Fitzgerald, 2012). Indeed, the optimization and enhancement of GABA production has been reported through various novel techniques. These include immobilized cell technology, coculturing GABA-producing strains, and improving a great variety of medium cultures of cells, since the chemical addition of the amino acid is considered unnatural and unsafe (Kim, Lee, Ji, Lee, & Hwang, 2009; Li & Cao, 2010; Seok et al., 2008).

2.1. GABA production by lactic acid bacteria

It is difficult to extract GABA from microorganisms because of the low content in natural biological tissues, and chemical synthesis has been rejected because of the corrosive reactants that are used. However, various studies have reported GABA-producing ability by lactic acid bacteria species/subspecies and the presence of GAD activity in their cells. Vast concentrations of gamma-aminobutyric acid production by LAB have also been shown. *Lactobacillus brevis* PM17, *Lactobacillus plantarum* C48, *Lactobacillus paracasei* PF6, *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* PR1 and *Lactococcus lactis* PU1 isolated from several types of cheeses produced GABA concentrations from 15 to 63 mg/kg in different culture media (Siragusa et al., 2007). Among *L. brevis* strains, *L. brevis* OPY-1 and *L. brevis* OPK-3 isolated from kimchi produced 0.825 g/l and 2.023 g/l, respectively (Park & Oh, 2005, 2007). *L. brevis* NCL912 from Poacai produced 35.66 g/l (Li, Qiu, Gao, & Cao, 2009b) and *L. brevis* GABA057 produced 23.40 g/l. In addition, *L. brevis* GABA100 produced 27.6 mg/ml in black raspberry juice (Kim et al., 2009) and *L. brevis* BJ20 produced 2.465 mg/L in a fermented sea tangle solution (Lee et al., 2010). *L. brevis* IFO 12005 produced 1.049 g/l (Yokoyama, Hiramatsu, & Hayakawa, 2002) and, recently, Diana et al. (2014) found 100 mg/l of GABA produced by *L. brevis* CECT8183 isolated from an artisan Spanish cheese. *L. brevis* CGMCC1306 isolated from fresh milk produced one of the highest concentrations found (76.36 g/l) (Huang, Mei, Sheng, Yao, & Lin, 2007b; Huang, Mei, Wu, & Lin, 2007a). There are many other publications showing GABA production from different lactic acid species isolated from kimchi (Cho, Chang, & Chang, 2007; Lu, Chen, Gu, & Han, 2008; Seok et al., 2008), koumiss (Sun

et al., 2009), cheese starter (Nomura, Kimoto, Someya, & Furukawa, 1998), Myanmar fermented tinfoil barb (Su, Takeshi, & Tianyao, 2011), red seaweed beverage (Ratanaburee, Kantachote, Charernjiratrakul, Penjamras, & Chaiyasut, 2011), wholemeal wheat sourdough (Rizzello, Cassone, Di Cagno, & Gobbetti, 2008), human intestines and dental caries (Barrett, Ross, O'Toole, Fitzgerald, & Stanton, 2012), carrot leaves (Tamura et al., 2010) and Japanese traditional fermented fish (tuna sushi) (Komatsuzaki, Shima, Kawamotoa, Momosed, & Kimurab, 2005), among others.

LAB's high GABA production is related to the activity of the GAD enzyme in the cells. The concentration of glutamic acid in the food matrix should be high enough. Accordingly, GABA-producing LAB can be used to develop fermented health-oriented food.

2.2. GABA production by other microorganisms and plants

Although LAB are the most studied GABA-producers, a number of fungi microorganisms have also been found to contain GABA in their cells. Filamentous fungi such as *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* and *Neurospora crassa* were found to have a considerable GABA pool (Kubicek et al., 1979; Schmit & Brody, 1975). Other fungi like *Monascus purpureus* showed GABA production in rice and nutrient culture media (Jannoey et al., 2010; Su, Wang, Lin, & Pan, 2003) and two *Rhizopus microsporus* strains produced high levels of GABA in fermented soybeans (Aoki et al., 2003). Strains isolated from the sea have also been reported. One *Candida* strain and three *Pichia* isolated from the Pacific Ocean near Japan showed high GABA synthesis ability (Guo, Aoki, Hagiwara, Masuda, & Watabe, 2009). Another four strains belonging to the *Saccharomyces* genera from the same marine yeast collection barely produced GABA (Masuda, Guo, Uryu, Hagiwara, & Watabe, 2008). A pseudomonas species isolated from the marine environment also produced the compound (Mountfort & Pybus, 1992).

Apart from LAB, *Streptomyces* genera isolated from tea produced GABA in a nutrient broth (Jeng, Chen, & Fang, 2007) and faecal *Escherichia coli* also synthesized GABA, which suggests that the colon is a potential source of the bioactive component (Mardini, Jumaili, Record, & Burke, 1991).

The role of GABA in plants is still vague, although it is known that their response to stress conditions and during fungal infection involves changes in GABA (Solomon & Oliver, 2001). For example, in response to cold shock or mechanical stimulation, GABA levels in soybean leaves rise 20- to 40-fold within 5 min, up to 1–2 μmol/g FW (Wallace, Secor, & Schrader, 1984). GABA is also involved in plant development and/or differentiation processes (Gallego, Whotton, Picton, Grierson, & Gray, 1995) and reproduction (Yang, 2003). It is well-known that GABA accumulation in plants is important in pH regulation, as GAD is activated by increases in cytosolic levels of H⁺ or Ca²⁺. GABA storage is also useful in a plant's defence against phytophagous insects and as an alternative way to use glutamic acid. Cultivar and culture conditions have been proposed for GABA accumulation in germinated fava beans (Li et al., 2009a) and in the germination of brown rice (Banchuen, Thammarutwasik, Ooraikul, Wuttijumnong, & Sirivongpaisal, 2010; Oh, 2003).

2.3. Mechanisms and techniques to improve GABA production

The key factors that affect GABA production by microorganisms in culture media are pH and the amount of precursor (glutamic acid or its salts) and other culture media additives, such as carbon or nitrogen sources. Other cultivation parameters can be optimized by the biochemical properties of GAD. The optimum pH for glutamate decarboxylase activity is strictly species-dependent. For instance, the optimum pH for *E. coli* is 3.8, while for *N. crassa* and *L. brevis* it is 5.0 and 4.2, respectively (Yang et al., 2006). As the pH in fermentation media changes with time, pH could be adjusted to maintain the most efficient production (Li, Qiu, Huang, & Cao, 2010). Several authors have reported that glutamate addition increases GABA yield in different culture media (Hayakawa, Ueno, Kawamura, Taniguchi, & Oda, 1997; Huang et al., 2007a, 2007b; Komatsuzaki et al., 2005; Li, Bai, Jin, Wen, & Gu, 2010), although the response differs among the strains (Yang et al., 2008). Similarly, pyridoxal 5' phosphate (PLP) used as a coenzyme to enhance GAD activity increased GABA production during fermentation in some strains (Coda, Rizzello, & Gobetti, 2010; Komatsuzaki et al., 2005; Yang et al., 2008), but had no effect on grape must fermentation, primarily due to some strains' own production of PLP (Di Cagno et al., 2009).

During the last decade, genetically engineered techniques have been developed to enhance GABA synthesis. A *Bacillus* strain was used to improve GABA in a traditional Korean fermented soybean product by expressing glutamate decarboxylase from a *L. brevis* strain (Park & Oh, 2006). Similarly, the glutamate decarboxylase gene was isolated from a *L. plantarum* to recombine with *Lactobacillus casei* isolated from kimchi (Kook et al., 2010). Recently, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 has been genetically engineered to synthesize GABA using endogenous glutamate from a *L. brevis* strain (Shi & Li, 2011).

Another novel and efficient system for raising the GABA level in media is the co-culture of GABA-producing strains. As Watanabe, Hayakawa, and Ueno (2011) reported, two strains separately produced less than 5 mM of GABA. When the strains were cultivated together the GABA content increased to 15 mM. Immobilized cell technology has been reported to be very useful in optimizing GABA production. The technique consists of entrapping high GABA-producing strains on Ca-alginate gel beads (Huang et al., 2007a, 2007b). An efficient technological method at a large scale has been proposed by Zhang, Liu, Yang, Xia, and Rao (2006). It consists of a bioconversion broth for the industrial production of GABA using L-glutamate and the strain *L. plantarum* GB01-21.

3. GABA enriched-food: potential applications

Natural GABA was first found as a constituent of tuber tissue in potato (Steward, Thompson, & Dent, 1949). GABA is naturally present in small quantities in many plant sources: in vegetables such as spinach, potatoes, cabbage, asparagus, broccoli and tomatoes; in fruits, such as apples and grapes; and in cereals, for example barley and/or maize (Oh et al., 2003b). Recently, Pradeep, Manisha, and Malleshi (2011) suggested that

germinated millets and legumes are a good source of GABA, and supported the development of functional cereal-based foods especially for children and elderly people. A high amount of GABA is found mainly in fermented products, especially fermented dairy products (Hayakawa et al., 2004), soy sauces (Yamakoshi et al., 2007), and cheeses (Siragusa et al., 2007). Generally, the human body can produce its own supply of GABA. However, GABA production is sometimes inhibited by a lack of oestrogen, zinc or vitamins, or by an excess of salicylic acid and food additives (Aoshima & Tenpaku, 1997). Indeed, GABA-enriched food is required because the GABA content in the typical daily human diet is relatively low (Oh, Moon, & Oh, 2003a).

Table 3 shows the GABA-enriched food products described in the literature.

3.1. Cereal-based products

Many GABA-enriched food products are cereal-related. Numerous studies have reported the potential use of selected LAB on fermented sourdough, resulting in a GABA-enriched sourdough that could increase the GABA content in the final bread making. Rizzello et al. (2008) reported the highest synthesis of GABA (258.7 mg/kg) in wholemeal wheat sourdough made using selected LAB, compared with other white wheat flours or rye flours. A wide variety of cereals, pseudo-cereals and leguminous flours with well-characterized GABA-producing strains have been used to make GABA-enriched sourdough and bread (504 mg/kg), with a blend of the most suitable cereal flours to be enriched by GABA (chickpea, amaranth, quinoa and buckwheat) (Coda et al., 2010). The highest GABA content ever found was in Bathura sourdough bread (226.22 mg/100 g) (Bhanwar, Bamnia, Ghosh, & Ganguli, 2013), followed by GABA-enriched bread (115 ppm) made with exogenous supplementation of recombinantly produced GAD from *Yersinia intermedia* (Lamberts, Joye, Beliën, & Delcour, 2012). Another study showed the GABA-enrichment of breakfast cereal flakes by recipe and process optimization with the inclusion of bran, quinoa or malt flour, which resulted in a GABA level of 66 ppm, 90 ppm and 258 ppm, respectively (Joye et al., 2011). Oat fermented with a fungi strain (*Aspergillus oryzae*) produced the highest amount of GABA (435.2 µg/g) (Cai et al., 2012). Moreover, by manipulating germination conditions, GABA concentrations have been optimized in different types of cereals. Nagaoka (2005) obtained a wheat germ rich in GABA (163 mg/100 g) and 9.2 mM was reached in barley bran under optimal conditions (Jin, Kim, & Kim, 2013). Maximal optimized GABA production (42.9 mg/100 g) was found in foxtail millet (Bai, Fan, Gu, Cao, & Gu, 2008) and 14.3 mg/100 g was obtained in germinated waxy hull-less barley under controlled conditions (Chung, Jang, Cho, & Lim, 2009). During the last decade, rice has been a focus for GABA-enrichment, in particular germinated brown rice (GBR) that was found to have 10 times more GABA than milled white rice, and 2 times more than brown rice (Patil & Khan, 2011), and even more in controlled parameters such as soaking in water (Saikusa et al., 1994). GABA-enriched brown rice was achieved by proteolytic hydrolysis (2.26 g/100 g) and by high pressure treatment (Kinefuchi, Sekiya, Yamazaki, & Yamamoto, 1999; Zhang, Yao, & Chen, 2006). GABA-enhanced fermented

Table 3 – GABA-enriched food.

Food product	GABA content (mg/kg)	Reference
Cereal-based		
Wholemeal wheat sourdough	258.7	Rizzello et al., 2008
Whole wheat and soya sourdough	1000	Diana et al., 2014
Bathura sourdough bread	22.62	Coda et al., 2010
Bread with <i>Yersinia</i> GAD supplementation	115	Lamberts et al., 2012
Cereal bran flakes	66	Joye et al., 2011
Cereal quinoa flakes	90	Joye et al., 2011
Cereal malt flour flakes	258	Joye et al., 2011
Fermented oat by <i>Aspergillus</i> sp.	435.2	Cai et al., 2012
Wheat germ	1630	Nagaoka, 2005
Barley bran	948	Jin et al., 2013
Foxtail millet	429	Bai et al., 2008
Germinated waxy hull-less barley	143	Chung et al., 2009
Brown rice by proteolytic hydrolysis	22.6	Zhang et al., 2006
Brown rice by high pressure treatment	130	Kinefuchi et al., 1999
Glutinous brown rice (Laozao)	nr	Dai-xin et al., 2008
Diary products		
Cheese with <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> as starter	320	Pouliot-Mathieu et al., 2013
Cheddar cheese with probiotic strain	6773.5	Wang et al., 2010
Yogurt	nr	Park & Oh, 2006
Fermented soya milk	424.67	Park & Oh, 2006
Fermented milk from Tibet	nr	Sun et al., 2009
Fermented milk	970	Liu et al., 2011
Fermented milk	102	Hayakawa et al., 2004
Fermented milk	100–120	Inoue et al., 2003
Fermented goat's milk	28	Minervini et al., 2009
Fermented milk by strains isolated on old-style cheese	5000	Lacroix et al., 2013
Skimmed milk by strains isolated from Italian cheeses	15–99.9	Siragusa et al., 2007
Fermented skim milk by <i>L. helveticus</i>	113.35	Sun et al., 2009
Fermented milk	120	Inoue et al., 2003
Fermented milk by <i>L. plantarum</i>	77.4	Nejati et al., 2013
Fermented milk by LAB combination	144.5	Nejati et al., 2013
Fermented skim milk by <i>L. plantarum</i>	970	Liu et al., 2011
Low fat fermented milk by LAB combination and protease	806	Hayakawa et al., 2004
Black soybean milk	5420	Ko et al., 2013
Meat, vegetables and legumes		
Meat	100	Dai et al., 2012
Fermented pork sausage	nr	Ratanaburee et al., 2013
Fermented pork sausages	0.124	Li et al., 2009a
Japanese lactic-acid fermented fish	1300	Kuda et al., 2009
Red mustard leaf	1780	Kim et al., 2013
Cruciferous plants	300	Hattori et al., 2005
Vegetables	nr	Okita et al., 2009
Brassica product	nr	Norimura et al., 2009
Adzuki beans	2012	Liao et al., 2013
Soybean nodules	0.31	Serraj et al., 1998
Tempeh-like fermented soybean	3700	Aoki et al., 2003
Beverages		
White tea	505	Zhao et al., 2011
Black raspberry juice	27,600	Kim et al., 2009
Fermented grape must	9	Di Cagno et al., 2009
Sugar cane juice-milk	3200	Hirose et al., 2008
Fermented-pepper leaves based	263,000	Song et al., 2014
Fruit juice	579	Tamura et al., 2010
Honey-based beverages	nr	Hiwatashi et al., 2010
Beverage (not specified)	200	Kanehira et al., 2011
Rice shochu distillery lee	1560.5	Yokoyama et al., 2002
Other foods		
Potato snacks	1700	Nakamura et al., 2006
Chocolate	2800	Nakamura et al., 2009
Potatoes	160–610	Nakamura et al., 2006

nr, not reported.

glutinous brown rice (Laozao) was developed by fermentation with a *Rhizopus* strain at 28.5 °C for 48 h (Dai-xin et al., 2008). GABA has been analysed in several cereals such as brown rice germ, brown rice sprouts, barley sprouts, bean sprouts, beans, corn, barley and brown rice, with concentrations of 718, 389, 326, 302, 250, 199, 190 and 123 nmol/g DW, respectively (Oh et al., 2003a).

3.2. Dairy products

Cheeses, yogurt and fermented milk are the products that have been studied most for GABA enrichment by LAB, and many of them have potential in the management of hypertension. Cheese naturally enriched in GABA (16 mg of GABA/50 g of cheese), using *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strain as a starter, decreased blood pressure by 3.5 mmHg (Pouliot-Mathieu et al., 2013). Another cheddar cheese with a probiotic strain showed a higher GABA level than a control cheese (Wang, Dong, Chen, Cui, & Zhang, 2010).

GABA-enriched yogurt has also been obtained by different procedures (Park & Oh, 2006). Some commercial cheese starters were found to produce GABA, which increased during ripening in a skim milk culture (Nomura et al., 1998). Naturally fermented milk in Tibet had higher GABA levels than a commercial yogurt (Sun et al., 2009). Numerous studies on GABA enhancement in fermented milk have been reported, and many of them were found to have a hypotensive effect on rats (Hayakawa et al., 2004; Liu et al., 2011) and humans (Inoue et al., 2003; Nejati et al., 2013). Due to a mixed lactic acid bacteria starter, fermented goat's milk reached a GABA concentration of 28 mg/kg (Minervini, Bilancia, Siragusa, Gobbetti, & Caponio, 2009) and 500 mg/100 ml was obtained in fermented milk by the action of two lactic acid strains isolated from old-style cheese (Lacroix, St-Gelais, Champagne, & Vuilleumard, 2013). A range of 15–99.9 mg/kg of GABA was obtained in a skim milk from several LAB-producing strains isolated from Italian cheeses (Siragusa et al., 2007) and *Lactobacillus helveticus* showed good potential (113.35 mg/L) in a fermented skim milk, and could potentially be used in the management of hypertension (Sun et al., 2009). A dose of 10–12 mg of GABA in 100 ml of fermented milk significantly decreased BP within 2 or 4 weeks in a randomized, placebo-controlled trial in mild hypertensive patients (Inoue et al., 2003). One strain of *L. plantarum* produced 77.4 mg/kg of GABA after milk fermentation and, in combination with other lactic acid bacteria, GABA reached a concentration of 144.5 mg/kg, which is considered a suitable dosage for a mild hypertensive effect (Nejati et al., 2013).

The evidence of a GABA-hypotensive effect on rats has even been widely reported in milk fermented products. Systolic and diastolic BP in spontaneously hypertensive rats (SHR) significantly decreased after a diet of GABA-enriched skim milk (970 ppm) fermented by *L. plantarum* (Liu et al., 2011). Arterial pressure was also lower in SHR after 8 weeks of oral administration of fresh, low-fat GABA-enriched milk (80.6 mg/100 g) fermented with five mixed lactic acid bacteria and with added protease. Another non-fat fermented milk has a hypotensive effect on SHR and in normotensive rat at a low dose (Hayakawa et al., 2004).

3.3. Meat, vegetables and legumes

Meat, fish, soybean and vegetables are a group of fermented products that are also used for GABA-enhancement, and several techniques have been proposed in this area. Meat enriched with GABA (Dai et al., 2012) and enriched feedstuffs (Matsunaga, Saze, Matsunaga, & Suzuta, 2009) may relieve animal stress so that quality, nutritional meat can be produced. Fermented pork sausage was enriched with GABA using specific LAB starter cultures (Ratanaburee, Kantachote, Charemjiratrakul, & Sukhoom, 2013) and fig proteases (Li et al., 2009a) to add value to the meat. A high content of GABA was detected in a traditional Japanese lactic-acid fermented fish (Kuda et al., 2009).

Vegetables enriched with GABA have been proposed for health: studies have been carried out on mustard leaf (Kim et al., 2013) and a patent has been issued for cruciferous plants (Hattori, Tsusaki, & Tagaki, 2005). The effects of GABA-containing vegetables on the cardiac autonomic nervous system have been studied in young people (Okita et al., 2009) and the results highlight the benefits of GABA on sympathetic nerve activity. In a fermented *Brassica* product, lactic acid fermentation produced a high GABA concentration, which suggests that this product could be used as a new functional food material (Norimura et al., 2009).

Legumes enriched with GABA, particularly beans, have also been studied. Recently, Liao, Wang, Shyu, Yu, and Ho (2013) proposed specific processes and fermentation conditions for GABA enrichment in adzuki beans, to provide a new, natural functional food resource. Black soybean was used to produce GABA-enhanced fermented milk as an antidepressant candidate (Ko, Victor Lin, & Tsai, 2013). A novel tempeh-like fermented soybean with a high level of GABA was developed with a specific cultivation procedure (Aoki et al., 2003). Other studies have simulated effects such as hypoxia and drought stress. These conditions were found to affect GAD activity and, hence, GABA accumulation, in soybeans nodules (Serraj, Shelp, & Sinclair, 1998). Moreover, Torino et al. (2013) showed high GABA concentration as a potent antihypertension compound in the fermentation of lentils.

3.4. Beverages

Research on different types of GABA-enriched beverages has recently been published. In particular, Chinese teas have been widely studied. A total of 114 samples from 6 types of tea were analysed and it was concluded that white tea had higher GABA content than other types (Zhao et al., 2011).

Levels of GABA can be enhanced in juices, mainly by lactic acid fermentation (Di Cagno et al., 2009; Hirose et al., 2008; Kim et al., 2009; Song, Shin, & Baik, 2014) or by specific fruit cultivation processes (Tamura et al., 2010). An experiment on the durability of GABA in fruit juices during storage at different temperatures and after radiation was reported and it was concluded that GABA remains stable (Shimizu & Sawai, 2008).

The antihypertensive effect and the relief of fatigue after the consumption of beverages containing GABA were demonstrated in rats (Hiwatashi, Narisawa, Hokari, & Toeda, 2010) and in Japanese subjects (Kanehira et al., 2011), respectively.

Finally, an alcoholic Japanese beverage was found to contain a high GABA level, due to the growth of a GABA-producing lactic acid strain in the medium (Yokoyama et al., 2002).

3.5. Other enriched foods

Other food products have been used to enhance GABA levels and provide health effects. An increased concentration of GABA in potato tubers and the antihypertensive effect of a GABA-enriched potato snack (Noguchi et al., 2007) and enrichment in chocolate (28 mg of GABA in 10 g of chocolate) to provide a psychological stress-reducing effect (Nakamura, Takishima, Kometani, & Yokogoshi, 2009) have been demonstrated in rats and in human subjects, respectively. Another study showed a GABA content ranging from 16 to 61 mg/100 g FW in 22 varieties of potato (Nakamura, Nara, Noguchi, Ohshiro, & Koga, 2006).

GABA concentration has also been analysed in a great number of uncooked food products. Foods with GABA concentrations above 100 nmol/g DW are: brown rice germ, brown rice sprouts, barley sprouts, bean sprouts, beans, corn, barley, brown rice, spinach, potatoes, sweet potatoes, yams, kale and chestnuts. The vegetables spinach, potatoes, sweet potatoes, yams and kale contain 414, 166, 137, 129, 122 nmol GABA/g DW, respectively. The GABA concentration of chestnut is 188 nmol/g DW (Oh et al., 2003b).

4. Future trends and conclusion

Hypertension is one of the major causes of cardiovascular disease, which, in turn, is the main cause of death in the world. It is therefore necessary to take precautions to prevent the epidemic. The pharmaceutical industry is associated with the food industry in a modern framework that promotes the inclusion of bioactive molecules in food to help control some diseases. In fact, the development of functional foods has been a key area of nutritional research in economically powerful countries, as a result of the experience gained in recent decades. However, there is a current perception that bioactive compounds are obtained primarily synthetically. Therefore, the exploration of bioactive molecules from natural sources is important in the discovery of new compounds. The main interest in the short- and medium-term is to research the effective dose of bioactive compounds if added both in isolation and as they occur naturally in the food matrix. The increasing development of functional foods is marked by the tendency of consumers to promote and maintain their health. Indeed, the functional food market will grow by combining credible science with an understanding of consumers and their beliefs. Furthermore, the increased market share of novel food is of great benefit to the food industry. GABA research has been intensified in recent years, with numerous scientific studies clinically demonstrating its benefits in many physiological disorders, and particularly in hypertension, as GABA contributes efficiently to the regulation and stability of blood pressure. The generation of GABA from glutamic acid or its salt in probiotic cells and other natural resources such as plants or fungi is of added value to the food industry, because of the

notable increase in interest in natural and organic foods. Industrial scale production of GABA from marine sources may not be able to compete economically with lactic acid bacteria production. High performance production, optimization through different biotechnological techniques, and the discovery of new high-GABA producing strains will remain a focus of interest in research into GABA as a health-related novel biological active compound. Testing and validation is yet another important step in increasing the prospects for clinical trials of bioactive molecules.

Acknowledgements

This study was supported by Europastry, S.A., through the grant program of the Centre for Industrial Technological Development IDI-20110755.

REFERENCES

- Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., & Yokogoshi, H. (2006). Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors (Oxford, England)*, 6(3), 1–8.
- Abe, Y., Umemura, S., Sugimoto, K. I., Hirawa, N., Kato, Y., Yokoyama, N., Yokoyama, T., Junichi, I., & Masao, I. (1995). Effect of green tea rich in γ -aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats. *American Journal of Hypertension*, 8(1), 74–79.
- Abel, M. S., & McCandless, D. W. (1992). Elevated γ -aminobutyric acid levels attenuate the metabolic response to bilateral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, 58(2), 740–744.
- Adeghate, E., & Ponery, A. S. (2002). GABA in the endocrine pancreas: Cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue and Cell*, 34, 1–6.
- Anthony, N. M., Harrison, J. B., & Sattelle, D. B. (1993). GABA receptor molecules of insects. In Y. Pichon (Ed.), *Comparative molecular neurobiology* (Vol. 63, pp. 172–209). Cambridge, England: Birkhäuser.
- Aoki, H., Uda, I., Tagami, K., Furuya, Y., Endo, Y., & Fujimoto, K. (2003). The production of a new tempeh like fermented soybean containing a high level of γ -aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(5), 1018–1023.
- Aoshima, H., & Tenpaku, Y. (1997). Modulation of GABA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by 13-L-hydroxylinoleic acid and food additives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(12), 2051–2057.
- Bai, Q. Y., Fan, G. J., Gu, Z. X., Cao, X. H., & Gu, F. R. (2008). Effects of culture conditions on γ -aminobutyric acid accumulation during germination of foxtail millet (*Setaria italica* L.). *European Food Research and Technology*, 228, 169–175.
- Banchuen, J., Thammarutwasik, P., Ooraikul, B., Wuttijumnong, P., & Sirivongpaisal, P. (2010). Increasing the bio-active compounds contents by optimizing the germination conditions of Southern Thai brown rice. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 32(3), 219–230.
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 411–417.

- Battaglioli, G., Liu, H., & Martin, D. L. (2003). Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: Implications for the regulation of GABA synthesis. *Journal of Neurochemistry*, 86(4), 879–887.
- Bertoldi, M., Carbone, V., & Borri-Voltattorni, C. (1999). Ornithine and glutamate decarboxylases catalyse an oxidative deamination of their alpha-methyl substrates. *The Biochemical Journal*, 342, 509–512.
- Bhanwar, S., Bamnia, M., Ghosh, M., & Ganguli, A. (2013). Use of *Lactococcus lactis* to enrich sourdough bread with γ -aminobutyric acid. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 77–81.
- Bjork, J. M., Moeller, F. G., Kramer, G. L., Kram, M., Suris, A., Rush, A. J., & Petty, F. (2001). Plasma GABA levels correlate with aggressiveness in relatives of patients with unipolar depressive disorder. *Psychiatry Research*, 101(2), 131–136.
- Borden, L., Murali Dhar, T., & Smith, K. (1994). Tiagabine, SK&F, 89976-A, CI-996 and NNC-711 are selective for the cloned GABA transporter GAT-1. *European Journal of Pharmacology*, 269, 219–224.
- Cai, S., Gao, F., Zhang, X., Wang, O., Wu, W., Zhu, S., Zhang, D., Zhou, F., & Ji, B. (2012). Evaluation of γ -aminobutyric acid, phytate and antioxidant activity of tempeh like fermented oats (*Avena sativa* L.) prepared with different filamentous fungi. *Journal of Food Science and Technology*, doi:10.1007/s13197-012-0748-2.
- Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B. J., Ron, E., & Faure, D. (2006). GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7460–7464.
- Cho, Y. R., Chang, J. Y., & Chang, H. C. (2007). Production of γ -amino-butyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 104–109.
- Chung, H. J., Jang, S. H., Cho, H. Y., & Lim, S. T. (2009). Effects of steeping and anaerobic treatment on GABA (gamma-aminobutyric acid) content in germinated waxy hull-less barley. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1712–1716.
- Coda, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food Microbiology*, 137, 236–245.
- Dai, S. F., Gao, F., Xu, X. L., Zhang, W. H., Song, S. X., & Zhou, G. H. (2012). Effects of dietary glutamine and gamma-aminobutyric acid on meat colour, pH, composition, and water-holding characteristic in broilers under cyclic heat stress. *British Poultry Science*, 53, 471–481.
- Dai-xin, H., Lu, Z., Lan, J., Li-te, L., & Yong-Qiang, C. (2008). Development of Laozao enriched with GABA. *Food Science & Technology*, 1, 22–25.
- DeFeudis, B. (1981). Muscimol binding and GABA receptors. *Drug Development Research*, 1, 93–105.
- Diana, M., Tres, A., Quílez, J., Llombart, M., & Rafecas, M. (2014). Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 351–355.
- Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizzello, C. G., Angelis, M. D. E., Giuliani, G., Meloni, M., Servi, B. D. E., & Marco, G. (2009). Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: Functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 731–741.
- Gallego, P., Whotton, L., Picton, S., Grierson, D., & Gray, J. (1995). A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening: The characteristics of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site. *Plant Molecular Biology*, 27, 1143–1151.
- Guo, X. F., Aoki, H., Hagiwara, T., Masuda, K., & Watabe, S. (2009). Identification of high gamma-aminobutyric acid producing marine yeast strains by physiological and biochemical characteristics and gene sequence analyses. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 1527–1534.
- Han, D., Kim, H. Y., Lee, H. J., Shim, I., & Hahm, D. H. (2007). Wound healing activity of gamma-aminobutyric acid (GABA) in rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(10), 1661–1669.
- Hao, R., & Schmit, J. C. (1993). Cloning of the gene for glutamate decarboxylase and its expression during conidiation in *Neurospora crassa*. *The Biochemical Journal*, 293, 735–738.
- Harnedy, P. A., & Fitzgerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and selfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4, 6–24.
- Hattori, T., Tsusaki, S., & Tagaki, K. (2005). Food using γ -aminobutyric acid-enriched cruciferous plant. US6623458B1.
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., & Yamori, Y. (2004). Effect of γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *The British Journal of Nutrition*, 92, 411–417.
- Hayakawa, K., Ueno, Y., Kawamura, S., Taniguchi, R., & Oda, K. (1997). Production of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria. *Seibutsu Kagaku*, 75, 239–244.
- Hirose, N., Ujihara, K., Teruya, R., Maeda, G., Yoshitake, H., Wada, K., & Yoshimoto, M. (2008). Development of GABA-enhanced lactic acid beverage using sugar cane and its functionality. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 55, 209–214.
- Hiwatashi, K., Narisawa, A., Hokari, M., & Toeda, K. (2010). Antihypertensive effect of honey-based beverage containing fermented rice bran in spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 57, 40–43.
- Huang, C.-Y., Kuo, W.-W., Wang, H.-F., Lin, C.-J., Lin, Y.-M., Chen, J.-L., Kuo, C.-H., Chen, P.-K., & Lin, J.-Y. (2014). GABA tea ameliorates cerebral cortex apoptosis and autophagy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 6, 534–544.
- Huang, J., Mei, L., Wu, H., & Lin, D. (2007a). Biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 865–871.
- Huang, J., Mei, L., Sheng, Q., Yao, S., & Lin, D. (2007b). Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15, 157–161.
- Imam, M., Ishaka, A., Ooi, D. J., Zamri, N., Sarega, N., Ismail, M., & Esa, N. M. (2014). Germinated brown rice regulates hepatic cholesterol metabolism and cardiovascular disease risk in hypercholesterolaemic rats. *Journal of Functional Foods*, 8, 193–203.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., & Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 490–495.
- Ito, K., Tanaka, K., Nishibe, Y., Hasegawa, J., & Ueno, H. (2007). GABA-synthesizing enzyme, GAD67, from dermal fibroblasts: Evidence for a new skin function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(2), 291–296.
- Jannoey, P., Niamsup, H., Lumyong, S., Suzuki, T., Katayama, T., & Chairate, G. (2010). Comparison of gamma-aminobutyric acid

- production in Thai rice grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 257–263.
- Jeng, K. C., Chen, C. S., & Fang, Y. P. (2007). Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in Pu-erh tea. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 55, 8787–8792.
- Jin, W., Kim, M., & Kim, K. (2013). Utilization of barley or wheat bran to bioconvert glutamate to γ -aminobutyric acid (GABA). *Journal of Food Science*, 78(9), 1376–1382.
- Johnson, B. S., Singh, N. K., Cherry, J. H., & Locy, R. D. (1997). Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea. *Phytochemistry*, 46(1), 139–144.
- Joye, I. J., Lamberts, L., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2011). In situ production of γ -aminobutyric acid in breakfast cereals. *Food Chemistry*, 129, 395–401.
- Kajimoto, O., Hirata, H., Nakagawa, S., Kajimoto, Y., Hayakawa, K., & Kimura, M. (2004). Hypotensive effect of fermented milk containing γ -amino butyric acid (GABA) in subjects with high normal blood pressure. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 51, 79–86.
- Kanehira, T., Nakamura, Y., Nakamura, K., Horie, K., Horie, N., Furugori, K., Sauchi, Y., & Yokogoshi, H. (2011). Relieving occupational fatigue by consumption of a beverage containing γ -amino butyric acid. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, 57(1), 9–15.
- Kato, Y., Furukawa, K., & Hara, S. (2002). Cloning and nucleotide sequence of the glutamate decarboxylase-encoding gene *gadA* from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(12), 2600–2605.
- Kayahara, H., & Sugiura, T. (2001). Research on physiological function of GABA in recent years—improvement function of brain function and anti-hypertension. *Japanese Journal of Food Development*, 36(6), 4–6.
- Kazemi, H., & Hoop, B. (1991). Glutamic acid and gamma-aminobutyric acid neurotransmitters in central control of breathing. *Journal of Applied Physiology*, 70(1), 1–7.
- Kelly, C., & Saravanan, V. (2008). Treatment strategies for a rheumatoid arthritis patient with interstitial lung disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9, 3221–32230.
- Kim, J. Y., Lee, M. Y., Ji, G. E., Lee, Y. S., & Hwang, K. T. (2009). Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 12–16.
- Kim, Y., Lee, M., Kim, S., Kim, H., Chung, E., Lee, J., & Park, S. (2013). Accumulation of γ -aminobutyric acid and transcription of glutamate decarboxylase in *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Omics Journal*, 6(4), 263–267.
- Kinefuchi, M., Sekiya, M., Yamazaki, A., & Yamamoto, K. (1999). Accumulation of GABA in brown rice by high pressure treatment: Manufacture of processed brown rice enriched with GABA accumulation using high pressure treatment. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 46, 323–328.
- Kleinrok, Z., Matuszek, M., Jesipowicz, J., Opolski, A., & Radzikowski, C. (1998). GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as S.C. tumors in a thymic nu/nu mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 49, 303–310.
- Ko, C., Victor Lin, H., & Tsai, G. (2013). Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*, 48, 559–568.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momosed, H., & Kimurab, T. (2005). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22, 497–504.
- Kook, M. C., Seo, M. J., Cheigh, C. I., Lee, S. J., Pyun, Y. R., & Park, H. (2010). Enhancement of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2–16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(6), 816–820.
- Krystal, J. H., Sanacora, G., Blumberg, H., Anand, A., Charney, D. S., Marek, G., Epperson, C. N., Goddard, A., & Mason, G. F. (2002). Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Molecular Psychiatry*, 7, 71–80.
- Kubicek, C. P., Hampel, W., & Rohr, M. (1979). Manganese deficiency leads to elevated amino acid pools in critic acid accumulating *Aspergillus niger*. *Archives of Microbiology*, 123, 73–79.
- Kuda, T., Tanibe, R., Mori, M., Take, H., Michihata, T., & Yano, T. (2009). Microbial and chemical properties of aji-no-susu, a traditional fermented fish with rice product in the Noto Peninsula, Japan. *Fisheries Science*, 75, 1499–1506.
- Lacroix, N., St-Gelais, D., Champagne, C. P., & Vuillemer, J. C. (2013). Gamma-aminobutyric acid-producing abilities of lactococcal strains isolated from old-style cheese starters. *Dairy Science & Technology*, 9, 315–327.
- Lamberts, L., Joye, I., Beliën, T., & Delcour, J. (2012). Dynamics of γ -aminobutyric acid in wheat flour bread making. *Food Chemistry*, 130, 896–901.
- Lee, B. J., Kim, J. S., Kang, Y. M., Lim, J. H., Kim, Y. M., Lee, M. S., Jeong, M. H., Ahn, C. B., & Je, J. Y. (2010). Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods. *Food Chemistry*, 122(1), 271–276.
- Leventhal, A., Wang, Y., Pu, M., Zhou, Y., & Ma, Y. (2003). GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science*, 300, 812–815.
- Li, H., & Cao, Y. (2010). Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*, 39, 1107–1116.
- Li, J., Izumimoto, M., Yonehara, M., Hirotsu, S., Kuriki, T., Naito, I., & Yamada, H. (2009a). The influence of fig proteases on the inhibition of angiotensin I-converting and GABA formation in meat. *Animal Science Journal*, 80(6), 691–696.
- Li, H., Qiu, T., Gao, D., & Cao, Y. (2009b). Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino Acids*, 38, 1439–1445. doi:10.1007/s00726-009-0355-3.
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y. (2010). Production of gamma aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell*, 9, 85.
- Li, Y., Bai, Q., Jin, X., Wen, H., & Gu, Z. (2010). Effects of cultivar and culture conditions on γ -aminobutyric acid accumulation in germinated fava beans (*Vicia faba* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(1), 52–57.
- Liao, W. C., Wang, C. Y., Shyu, Y. T., Yu, R. C., & Ho, K. C. (2013). Influence of preprocessing methods and fermentation of adzuki beans on γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation by lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1108–1115.
- Liu, C. F., Tung, Y. T., Wu, C. L., Lee, B.-H., Hsu, W.-H., & Pan, T. M. (2011). Antihypertensive effects of *Lactobacillus*-fermented milk orally administered to spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4537–4543.
- Lu, X., Chen, Z., Gu, Z., & Han, Y. (2008). Isolation of gamma-aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochemical Engineering Journal*, 41, 48–52.
- Maras, B., Sweeney, G., Barra, D., Bossa, F., & John, R. A. (1992). The amino acid sequence of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 204, 93–98.

- Mardini, H., Jumaili, B., Record, C. O., & Burke, D. (1991). Effect of protein and lactulose on the production of gamma-aminobutyric acid by faecal *Escherichia coli*. *Gut*, 32, 1007–1010.
- Masuda, K., Guo, X., Uryu, N., Hagiwara, T., & Watabe, S. (2008). Isolation of marine yeasts collected from the Pacific ocean showing a high production of γ -aminobutyric acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 3265–3272.
- Matsubara, F., Ueno, H., Kentaro, T., Tadano, K., Suyama, T., Imaizumi, K., Suzuki, T., Magata, K., & Kikuchi, N. (2002). Effects of GABA supplementation on blood pressure and safety in adults with mild hypertension. *Japanese Pharmacology and Therapy*, 30, 963–972.
- Matsunaga, M., Saze, K., Matsunaga, T., & Suzuta, Y. (2009). Feedstuff and method for supply of gamma-aminobutyric acid. US 20090181121 A1.
- Meldrum, B. S., & Chapman, A. G. (1999). Basic mechanisms of Gabitril (tiagabine) and future potential developments. *Epilepsia*, 40(9), 2–6.
- Minervini, F., Bilancia, M. T., Siragusa, S., Gobetti, M., & Caponio, F. (2009). Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology*, 26, 559–564.
- Minuk, G. Y. (2000). GABA and hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 207, 105–108.
- Mountfort, D. O., & Pybus, V. (1992). Effect of pH, temperature and salinity on the production of gamma aminobutyric acid (GABA) from amines by marine bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 101(4), 237–244.
- Nagaoka, H. (2005). Treatment of germinated wheat to increase levels of GABA and IP6 catalyzed by endogenous enzymes. *Biotechnology Progress*, 21, 405–410.
- Nakamura, H., Takishima, T., Kometani, T., & Yokogoshi, H. (2009). Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with gamma-aminobutyric acid (GABA) in humans: Assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 60(5), 106–113.
- Nakamura, K., Nara, K., Noguchi, T., Ohshiro, T., & Koga, H. (2006). Contents of gamma-aminobutyric acid (GABA) in potatoes and processed potato products. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 53(9), 514–517.
- Nathan, B., Bao, J., Hsu, C., Aguila, P., Wu, R., Yarom, M., Kuo, C., & Wu, J. (1994). A membrane form of brain L-glutamate decarboxylase: Identification, isolation, and its relation to insulin-dependent mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 242–246.
- Nejati, F., Rizzello, C., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F., & Gobetti, M. (2013). Manufacture of a functional fermented milk enriched of angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and gamma-amino butyric acid (gaBa). *LWT – Food Science and Technology*, 51(1), 183–189.
- Noguchi, T., Nakamura, K., Nagai, T., Katsuda, S., & Koga, H. (2007). Antihypertensive effects of GABA-enriched potato snacks in spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 54(2), 75–81.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., & Furukawa, S. (1998). Production of γ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 81, 1486–1491.
- Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y., & Kobayashi, M. (1999). *Lactococcus lactis* contains only glutamate decarboxylase gene. *Microbiology (Reading, England)*, 154, 1375–1380.
- Norimura, N., Sonomoto, K., Maki, T., Maeda, M., Kobayashi, G., & Komatsu, Y. (2009). The enhancing effect of gamma-amino butyric acid (GABA) concentration and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory capacity in varieties of Brassica. <<http://agris.fao.org/aos/records/JP2009004544>>.
- Oh, C. H., & Oh, S. H. (2004). Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 19–23.
- Oh, S. H. (2003). Stimulation of gamma-aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/Glu germination solution and calcium/calmodulin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 319–325.
- Oh, S. H., Moon, Y. J., & Oh, C. H. (2003a). γ -Aminobutyric acid (GABA) content of selected uncooked foods. *Journal of Food Sciences and Nutrition*, 8, 75–78.
- Oh, S. H., Soh, J. R., & Cha, Y. S. (2003b). Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *Journal of Medicine Food*, 6, 115–121.
- Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R., & Takahashi, T. (2000). Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness depression, autonomic disorder by oral administration. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 47(8), 596–603.
- Okita, Y., Nakamura, H., Kouda, K., Takahashi, I., Takaoka, T., & Kimura, M. (2009). Effects of vegetable containing gamma-aminobutyric acid on the cardiac autonomic nervous system in healthy young people. *Journal of Physiology Anthropology*, 28, 101–107.
- Opolski, A., Mazurkiewicz, M., Wietrzyk, J., Kleinrok, Z., & Radzikowski, C. (2000). The role of GABA-ergic system in human mammary gland pathology and in growth of transplantable murine mammary cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 19(3), 383–390.
- Park, K. B., & Oh, S. H. (2005). Production and characterization of GABA rice yogurt. *Food Science and Biotechnology*, 14, 518–522.
- Park, K. B., & Oh, S. H. (2006). Enhancement of gamma-aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 28, 1459–1463.
- Park, K. B., & Oh, S. H. (2007). Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresource Technology*, 98, 312–319.
- Parkash, J., & Kaur, G. (2007). Potential of PSA-NCAM in neuronal plasticity in the adult hypothalamus: Role of noradrenergic and GABAergic neurotransmitters. *Brain Research Bulletin*, 74, 317–328.
- Patil, S. B., & Khan, M. K. (2011). Germinated brown rice as a value added rice product: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 661–667.
- Petty, F. (1994). Plasma concentrations of gamma-aminobutyric acid (GABA) and mood disorders: A blood test for manic depressive disease? *Clinical Chemistry*, 40(2), 296–302.
- Pouliot-Mathieu, K., Gardner-Fortier, C., Lemieux, S., St-Gelais, D., Champagne, C. P., & Vuilleumard, J.-C. (2013). Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing acid lactic bacteria on blood pressure in men. *Pharmacology*, 1, 1–8.
- Pradeep, S. R., Manisha, G., & Malleshi, N. G. (2011). Germinated mills and legumes as a source of gamma-aminobutyric acid. *World Applied Sciences Journal*, 14(1), 108–113.
- Rapkin, A. J. (1999). Progesterone, GABA and mood disorders in women. *Archives of Women's Mental Health*, 2, 97–105.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., Penjamras, P., & Chaiyasut, C. (2011). Enhancement of γ -aminobutyric acid in a fermented red seaweed beverage by starter culture *Lactobacillus plantarum* DW12. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(3), 717–7458.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., & Sukhoon, A. (2013). Selection of c-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and their potential as probiotics

- for use as starter cultures in Thai fermented sausages (Nham). *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1371–1382.
- Rice, E. W., Johnson, C. H., Dunnigan, M. E., & Reasoner, D. J. (1993). Rapid glutamate decarboxylase assay for detection of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4347–4349.
- Rizzello, C. G., Cassone, A., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2008). Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6936–6943.
- Saikusa, T., Horino, T., & Mori, Y. (1994). Accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 2291–2292.
- Sasaki, S., Lee, L. C., Nakamura, Y., Iyota, I., Fukuyama, M., Inoue, A., Takeda, K., Yoshimura, M., Nakagawa, M., & Ijichi, H. (1996). Hypotension and hypothalamic depression produced by intracerebroventricular injections of GABA in spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 50(11), 1140–1148.
- Sasaki, S., Yokozawa, T., Cho, E. J., Oowada, S., & Kim, M. (2006). Protective role of γ -aminobutyric acid against chronic renal failure in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(11), 1515–1525.
- Satya Narayan, V., & Nair, P. M. (1990). Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry*, 29, 367–375.
- Schmit, J. C., & Brody, S. (1975). *Neurospora crassa* conidial germination: Role of endogenous amino acid pools. *Journal of Bacteriology*, 124, 232–242.
- Schuller, H. M., Al-Wadei, H. A., & Majidi, M. (2008). Gamma-aminobutyric acid, a potential tumor suppressor for small airway-derived lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 29(10), 1979–1985.
- Schwartz, R. D. (1988). The GABA A receptor gated ion channel: Biochemical and pharmacological studies of structure and function. *Biochemical Pharmacology*, 37, 3369.
- Seidl, R., Cairns, N., Singewald, N., Kaehler, S. T., & Lubec, G. (2001). Differences between GABA levels in Alzheimer's disease and Down syndrome with Alzheimer-like neuropathology. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 363(2), 139–145.
- Seok, J. H., Park, K. B., Kim, Y. H., Bae, M. O., Lee, M. K., & Oh, S. H. (2008). Production and characterization of kimchi with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid. *Food Science and Biotechnology*, 17, 940–946.
- Serraj, R., Shelp, B. J., & Sinclair, T. R. (1998). Accumulation of γ -aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress. *Physiologia Plantarum*, 102, 79–86.
- Shi, F., & Li, Y. (2011). Synthesis of gamma-aminobutyric acid by expressing *Lactobacillus brevis*-derived glutamate decarboxylase in the *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032. *Biotechnology Letters*, 33, 2469–2474.
- Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T., & Matsubayashi, T. (2009). Anti-hypertensive effect of γ -aminobutyric acid (GABA)-rich *Chlorella* on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clinical and Experimental Hypertension*, 31, 342–354.
- Shimizu, T., & Sawai, Y. (2008). Stability of gamma-aminobutyric acid in fruit juice during storage. *Food Preservation Science*, 34(3), 145–149.
- Shizuka, F., Kido, Y., Nakazawa, T., Kitajima, H., Aizawa, C., Kayamura, H., & Ichijo, N. (2004). Antihypertensive effect of gamma-amino butyric acid enriched soy products in spontaneously hypertensive rats. *Biofactors (Oxford, England)*, 22(1–4), 165–167.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7283–7290.
- Solomon, P. S., & Oliver, R. P. (2001). The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta*, 213, 241–249.
- Song, Y., Shin, N., & Baik, S. (2014). Physicochemical and functional characteristics of a novel fermented pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves-based beverage using lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 187–194.
- Steward, F. C., Thompson, J. F., & Dent, C. E. (1949). γ -Aminobutyric acid: A constituent of the potato tuber? *Science*, 110, 439–440.
- Streeter, C. C., Jensen, J. E., Perlmutter, R. M., Cabral, H. J., Tian, H., Terhune, D. B., Ciraulo, D. A., & Renshaw, P. F. (2007). Yoga Asana sessions increase brain GABA levels: A pilot study. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13(4), 419–426.
- Su, M. T., Takeshi, K., & Tianyao, L. (2011). Isolation, characterization, and utilization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Myanmar fishery products fermented with boiled rice. *Fisheries Science*, 77(2), 279.
- Su, Y. C., Wang, J. J., Lin, T. T., & Pan, T. M. (2003). Production of the secondary metabolites gamma-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 41–46.
- Sun, B. S. (2004). *Research of some physiological active substance by fermentation of Monascus spp.* (Dissertation for Master's Degree). China: Zhejiang Industry University, 40–55.
- Sun, T. S., Zhao, S. P., Wang, H. K., Cai, C. K., Chen, Y. F., & Zhang, H. P. (2009). ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *European Food Research and Technology*, 228, 607–612.
- Tamura, T., Noda, M., Ozaki, M., Maruyama, M., Matoba, Y., Kumagai, T., & Sugiyama, M. (2010). Establishment of an efficient fermentation system of gamma-aminobutyric acid by a lactic acid bacterium, *Enterococcus avium* G-15, isolated from carrot leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(10), 1673–1679.
- Tanaka, H., Watanabe, K., Ma, M., Hirayama, M., Kobayashi, T., Oyama, H., Sakaguchi, Y., Kanda, M., Kodama, M., & Aizawa, Y. (2009). The effects of γ -aminobutyric acid, vinegar, and dried bonito on blood pressure in normotensive and mildly or moderately hypertensive volunteers. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45, 93–100.
- Torino, M. I., Limón, R., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., & Frías, J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136, 1030–1037.
- Tsai, C., Chiu, T., Ho, C., Lin, P., & Wu, T. (2013). Effects of anti-hypertension and intestinal microflora of spontaneously hypertensive rats fed gamma aminobutyric acid-enriched Chingshey purple sweet potato fermented milk by lactic acid bacteria. *African Journal of Microbiological Research*, 7(11), 932–940.
- 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. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, 55(1), 75–80.
- Umekawa, H., Tatsuno, T., Wang, Y., Hirayama, M., Hattori, M., & Araki, T. (2008). Effect of Porphyra extract on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 10, 502–505.

- Wallace, W., Secor, J., & Schrader, L. (1984). Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiology*, 75, 170–175.
- Wang, H. K., Dong, C., Chen, Y. F., Cui, L. M., & Zhang, H. P. (2010). A new probiotic Cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content produced with Koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 62–70.
- Warskulat, U., Reinen, A., Grether-Beck, S., Krutmann, J., & Häussinger, D. (2004). The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in maintaining cell homeostasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 123, 516–521.
- Watanabe, Y., Cornélissen, G., Watanabe, M., Watanabe, F., Otsuka, K., Ohkawa, S.-I., Kikuchi, T., & Halberg, F. (2003). Effects of autogenic training and antihypertensive agents on circadian and circaseptan variation of blood pressure. *Clinical and Experimental Hypertension*, 25, 405–412.
- Watanabe, Y., Hayakawa, K., & Ueno, H. (2011). Effects of co-culturing LAB on GABA production. *Journal of Biological Macromolecules*, 11(1), 3–13.
- Wiens, S. C., & Trudeau, V. L. (2006). Thyroid hormone and γ -aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 144(3), 332–344.
- Wong, C. G., Bottiglieri, T., & Snead, O. C. (2003). GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology*, 54(6), 3–12.
- Wu, C., Huang, Y., Lai, X., Lai, R., Zhao, W., Zhang, M., & Zhao, W. (2014). Study on quality components and sleep-promoting effect of GABA Maoyecha tea. *Journal of Functional Foods*, 7, 180–190.
- Xie, Z., Xia, S., & Le, G.-W. (2014). Gamma-aminobutyric acid improves oxidative stress and function of the thyroid in high-fat diet fed mice. *Journal of Functional Foods*, 8, 76–86.
- Xu, C. W., & Xia, Y. H. (1999). Clinical observations on the control acute attack of deficiency-syndrome asthma with γ -aminobutyric acid. *Chinese Journal of Binzhou Medical College*, 22, 181.
- Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A., Matsuyama, A., Kikuchi, M., & Kawasaki, T. (2007). Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(1), 165–173.
- Yang, N. C., Zhou, K. Y., & Tseng, C. Y. (2012). Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 132(4), 1796–1801.
- Yang, S., Lu, Z., Lu, F., Bie, X., Sun, L., & Zeng, X. (2006). Simple method for rapid screening of bacteria with glutamate decarboxylase activities. *Journal of Rapid Methods & Automation of Microbiology*, 14, 291–298.
- Yang, S. Y., Lu, F. X., Lu, Z. X., Bie, X. M., Jiao, Y., Sun, L. J., & Yu, B. (2008). Production of gamma-aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation. *Amino Acids*, 34, 473–478.
- Yang, Z. (2003). GABA, a new player in the plant mating game. *Developmental Cell*, 5, 185–186.
- Yokoyama, S., Hiramatsu, J., & Hayakawa, K. (2002). Production of γ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(1), 95–97.
- Yoshimura, M., Toyoshi, T., Sano, A., Izumi, T., Fujii, T., Konishi, C., Inai, S., Matsukura, C., Fukuda, N., Ezura, H., & Obata, A. (2010). Antihypertensive effect of a γ -aminobutyric acid rich tomato cultivar 'DG03-9' in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 615–619.
- Zhang, H., Yao, H. Y., & Chen, F. (2006). Accumulation of gamma aminobutyric acid in rice germ using protease. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 1160–1165.
- Zhang, S.-C., Liu, T.-T., Yang, T.-W., Xia, H.-F., & Rao, Z.-M. (2006). Study on separation and purification technology of γ -aminobutyric acid by whole-cell bioconversion. *Food and Fermentation Industries*, 36(11), 1–5.
- Zhao, M., Ma, Y., Wei, Z. Z., Yuan, W. X., Li, Y. L., Zhang, C. H., Xue, X. T., & Zhou, H. J. (2011). Determination and comparison of γ -aminobutyric acid (GABA) content in pu-erh and other types of Chinese tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3641–3648.

4.5 Nuevas cepas de la especie *Lactobacillus brevis* para la elaboración de masas madres panarias

Marina Diana, Marta Llombart, Magdalena Rafecas y Joan Quílez
PCT/ES2013/070652, Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid

Resumen:

Esta patente refiere a las cepas *Lactobacillus brevis* CECT 8183, CECT 8181 y CECT 8182 y su uso para la producción de GABA , de medios enriquecidos en GABA, para la fabricación de alimentos funcionales, complementos nutricionales y/o farmacéuticos, así como la producción de GABA en masas madre.



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES NOTIFICACIÓN DE LA RECEPCIÓN DE LOS DOCUMENTOS QUE CONSTITUYEN SUPUESTAMENTE UNA SOLICITUD INTERNACIONAL PRESENTADA DE FORMA ELECTRÓNICA.

(Instrucciones Administrativas del PCT, Parte Séptima)

- 1.-Se notifica al solicitante que la Oficina Receptora ha recibido en la fecha de recepción indicada más abajo, los documentos que supuestamente constituyen una solicitud internacional.
- 2.-Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que la Oficina Receptora no ha comprobado aún si estos documentos satisfacen las condiciones del art. 11.1, es decir, si cumple los requisitos para que le sea atribuida una fecha de presentación internacional. En cuanto la Oficina Receptora haya comprobado los documentos, avisará al solicitante.
- 3.-El número de la supuesta solicitud internacional indicado más abajo ha sido otorgado automáticamente a estos documentos. Se invita al solicitante a mencionar este número en toda la correspondencia con la Oficina Receptora.

Número de presentación	300103272	
Solicitud Número PCT	PCT/ES2013/070652	
Fecha de recepción	19 septiembre 2013	
Oficina Receptora	Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid	
Referencia del expediente del solicitante o mandatario	EUPTRY_2013	
Solicitante	EUROPASTRY,S.A.	
Número de solicitantes	1	
País	ES	
Título de la invención	NUEVAS CEPAS DE LA ESPECIE LACTOBACILLUS BREVIS PARA LA ELABORACIÓN DE MASAS MADRES PANARIAS	
Documentos presentados	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-fees.xml eolf-biod-000001.xml	eolf-requ.xml eolf-seql.pdf (2 p.) eolf-gpoa-000001.xml eolf-vlog.xml

	eolf-appb-P000001.pdf (16 p.)	eolf-appb-P000002.pdf (1 p.)
	eolf-appb-P000003.pdf (1 p.)	eolf-abst.txt
	eolf-appb-P000004.pdf (2 p.)	eolf-gpoa-l000001.pdf (1 p.)
Presentado por	CN=NOMBRE DIEGUEZ GARBAYO PEDRO - NIF 05236487P,OU=500050022,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Método de Transmisión	Online	
Fecha y hora de expedición del recibo	19 septiembre 2013, 10:53 (CEST)	
Información oficial condensada de la presentación	B4:2F:6D:08:E6:4E:C6:30:B5:20:33:9F:7C:B9:CA:BE:B5:4A:63:4E	

/Madrid, Oficina Receptora/

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

0	Para uso de la oficina receptora únicamente	
0-1	Solicitud internacional No.	
0-2	Fecha de presentación internacional	
0-3	Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud Internacional PCT"	
0-4	Formulario PCT/RO/101 Petitorio PCT	
0-4-1	Preparado usando	PCT Online Filing Version 3.5.000.232 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-5	Petición El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes	
0-6	Oficina receptora (indicada por el solicitante)	Oficina Española de Patentes y Marcas (RO/ES)
0-7	Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	EUPTRY_2013
I	Título de la invención	NUEVAS CEPAS DE LA ESPECIE LACTOBACILLUS BREVIS PARA LA ELABORACIÓN DE MASAS MADRES PANARIAS
II	Solicitante	
II-1	Esta persona es:	Solicitante únicamente
II-2	Solicitante para	Todos los Estados designados
II-4	Nombre	EUROPASTRY,S.A.
II-5	Dirección	Plaza Xavier Cugat 2, Edificio C, 4 Planta 08174 St. Cugat del Valles - Barcelona España
II-6	Estado de nacionalidad	ES
II-7	Estado de domicilio	ES
III-1	Solicitante y/o inventor	
III-1-1	Esta persona es:	Inventor únicamente
III-1-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	DIANA PEREZ, Marina
III-1-5	Dirección	C/ Sevilla 115 08226 Terrasa - Barcelona España

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

III-2	Solicitante y/o inventor	
III-2-1	Esta persona es:	Inventor únicamente
III-2-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	LLOMBART CALCENA, Marta
III-2-5	Dirección	Travessera de les Corts 37 Izq. 3°B 08028 Barcelona España
III-3	Solicitante y/o inventor	
III-3-1	Esta persona es:	Inventor únicamente
III-3-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	RAFECAS MARTINEZ, Magdalena
III-3-5	Dirección	c/ Roselló 285 , 2° 2ª 08037 Barcelona España
III-4	Solicitante y/o inventor	
III-4-1	Esta persona es:	Inventor únicamente
III-4-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	QUILEZ GRAU, Juan
III-4-5	Dirección	c/ Ludwiig Van Beethoven 17 43007 Tarragona España
IV-1	Mandatario o representante común; o dirección para la correspondencia	
	La persona identificada a continuación se nombra/ha sido nombrada para actuar en nombre del/de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como:	Mandatario
IV-1-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	DIÉGUEZ GARBAYO, Pedro
IV-1-2	Dirección	C/ Orense nº10-1º 28020 Madrid España
IV-1-3	No. de teléfono	915566611
IV-1-4	No. de facsímil	915565431
IV-1-5	Correo electrónico	webmaster@kapler.com
IV-1-6	Nº de registro del mandatario en la Oficina	0708/0
V	DESIGNACIONES	
V-1	Según la Regla 4.9.a), la presentación de este petitorio constituye la designación de todos los Estados contratantes vinculados por el PCT en la fecha de presentación internacional a efectos de todo tipo de protección disponible y, cuando proceda, de la concesión tanto de patentes regionales como de patentes nacionales.	
VI-1	Reivindicación de prioridad de una solicitud nacional anterior	
VI-1-1	Fecha de presentación	20 Septiembre 2012 (20.09.2012)
VI-1-2	Número	P201231458
VI-1-3	País	ES

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

VI-2	Petición de documento de prioridad Se ruega a la Oficina receptora que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) anterior(es) identificada(s) supra como punto(s):	VI-1
VI-3	Incorporación por referencia : cuando un elemento de la solicitud internacional mencionado en el Artículo 11.1)iii)d) o e) o una parte de la descripción, de las reivindicaciones o de los dibujos mencionada en la Regla 20.5.a) no está contenido en otro lugar en esta solicitud internacional pero figura íntegramente en una solicitud anterior cuya prioridad se reivindica en la fecha en la que uno o varios elementos mencionados en el Artículo 11.1)iii) fueron recibidos inicialmente por la Oficina receptora, ese elemento o esa parte, a reserva de confirmación según la Regla 20.6, se incorporará por referencia en esta solicitud internacional a los efectos de la Regla 20.6.	
VII-1	Administración encargada de la búsqueda internacional elegida	Oficina Española de Patentes y Marcas (ISA/ES)
VII-2	Petición para que se utilicen los resultados de la búsqueda anterior; referencia a esa búsqueda	
VII-2-1	Fecha de presentación	20 Septiembre 2012 (20.09.2012)
VII-2-2	Número de solicitud	P201231458
VII-2-3	País (u Oficina regional)	ES
VIII	Declaraciones	Número de declaraciones
VIII-1	Declaración sobre la identidad del inventor	-
VIII-2	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, para solicitar y que le sea concedida una patente	-
VIII-3	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior	-
VIII-4	Declaración sobre la calidad de inventor (sólo para la designación de los Estados Unidos de América)	-
VIII-5	Declaración sobre las divulgaciones no perjudiciales o las excepciones a la falta de novedad	-

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

IX	Lista de verificación	Número de hojas	Fichero(s) electrónico(s) adjunto(s)
IX-1	Petitorio (incluidas las hojas de declaración)	5	✓
IX-2	Descripción (excluida la parte correspondiente a la lista de secuencias)	16	✓
IX-3	Reivindicaciones	1	✓
IX-4	Resumen	1	✓
IX-5	Dibujos	2	✓
IX-7a	Número subtotal de hojas	25	
IX-6	Lista de secuencias como parte de la descripción	2	✓
IX-7	TOTAL	27	
	Elementos de acompañamiento	Documento(s) en papel adjunto(s)	Fichero(s) electrónico(s) adjunto(s)
IX-8	Hoja de cálculo de tasas	-	✓
IX-10	Poder general original	-	✓
IX-15	Indicaciones separadas relativas a los microorganismos depositados u otro material biológico	-	✓
IX-18	Soporte físico PCT-SAFE	-	-
IX-20	Figura de los dibujos que debe acompañar el resumen	1	
IX-21	Idioma de presentación de la solicitud internacional	castellano	
X-1	Firma del solicitante , del mandatario o del representante común	(PKCS7 Firma Digital)	
X-1-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	Diéguez Garbayo, Pedro	
X-1-2	Nombre del firmante	NOMBRE DIEGUEZ GARBAYO PEDRO - NIF 05236487P	
X-1-3	Calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)	(Representante)	

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA ÚNICAMENTE

10-1	Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional	
10-2	Dibujos:	
10-2-1	Recibido	
10-2-2	No recibido	
10-3	Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior pero dentro del plazo, de documentos o de dibujos que completan la pretendida solicitud internacional	
10-4	Fecha de recepción, dentro del plazo, de las correcciones requeridas según el Artículo 11(2) del PCT	
10-5	Administración encargada de la búsqueda internacional	ISA/ES
10-6	Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda	

PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL ÚNICAMENTE

11-1	Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional	
------	---	--

PCT (ANEXO - HOJA DE CALCULO DE TASAS)

Impresión (original en formato electrónico)

(Esta hoja no forma parte de la solicitud internacional y no cuenta como una de sus hojas)

0	Para uso de la oficina receptora únicamente			
0-1	Solicitud internacional No.			
0-2	Sello con la fecha de la Oficina receptora			
0-4	Formulario PCT/RO/101 (Anexo) Hoja de cálculo de tasas PCT			
0-4-1	Preparado usando	PCT Online Filing Version 3.5.000.232 MT/FOP 20020701/0.20.5.20		
0-9	Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	EUPTRY_2013		
2	Solicitante	EUROPASTRY, S. A.		
12	Calculo de las tasas prescritas	Importe de la tasa/ multiplicador	Importes totales (EUR)	
12-1	Tasa de transmisión T	⇔	73.51	
12-2-1	Tasa de búsqueda S	⇔	1875	
12-2-2	Búsqueda internacional a efectuar por	ES		
12-3	Tasa de presentación internacional (30 primeras hojas) i1	1100		
12-4	Hojas restantes	0		
12-5	Cantidad adicional (X)	0		
12-6	Total de la cantidad adicional i2	0		
12-7	i1 + i2 = i	1100		
12-12	Réducción por presentación electrónica (imagen) R	-165		
12-13	Total de la tasa de presentación internacional (i-R) I	⇔	935	
12-14	Tasa por documento de prioridad			
	Número de documentos de prioridad solicitados	1		
12-15	Tasa por documento (X)	29.4		
12-16	Total de la tasa por documento de prioridad: P	⇔	29.4	
12-17	Tasa por la restauración del derecho de prioridad RP			
	Número de las peticiones de restauración del derecho de prioridad	0		
	Total de las tasas por la restauración del derecho de prioridad			
12-19	TOTAL DE LAS TASAS PAGADERAS (T+S+i+P+RP)	⇔	2912.91	
12-21	Modo de pago:	Efectivo		

NUEVAS CEPAS DE LA ESPECIE LACTOBACILLUS BREVIS PARA LA ELABORACIÓN DE MASAS MADRES PANARIAS

Descripción

5 Nuevas cepas de las especies *Lactobacillus brevis* para la elaboración de masas madres panarias.

La presente invención se refiere a las cepas CECT 8183, CECT 8181 y CECT 8182 de *Lactobacillus brevis* y su uso para la producción de ácido γ -amino butírico (GABA), de medios enriquecidos en GABA, para la fabricación de
10 alimentos funcionales, complementos nutricionales y/o farmacéuticos, así como un método para la producción de GABA en masas madres ácidas de pan o *sourdough* mediante dichas cepas.

Introducción

15

La hipertensión es una de las principales causas de las enfermedades cardiovasculares, ocupando el primer lugar de ingreso hospitalario e incluso la muerte en muchos países desarrollados. Esta enfermedad ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años en lo que se ha puesto de manifiesto
20 que lo hábitos alimentarios pueden ayudar a prevenirla.

El causante más importante de hipertensión es el consumo elevado de sal. Se considera que el 87,5% de la población consume más sal de la recomendada y que ésta se ingiere de forma mayoritaria a través de la alimentación. Actualmente, las dietas procuran incluir menos sal en sus composiciones, y los
25 nuevos sistemas de conservación (pasteurizados, refrigerados y congelados, alimentos envasados al vacío, etcétera.) permiten evitar por completo el empleo de la salazón en algunos alimentos. No obstante, su reducción implica una disminución de la intensidad del sabor del producto. Por este motivo, la inclusión de moléculas con capacidad funcional para la reducción de la
30 hipertensión en alimentos resulta novedosa y, lo que es más importante, tiene una escasa incidencia en la calidad sensorial del producto. En la actualidad, una de las familias más estudiadas son los péptidos bioactivos procedentes de

la fermentación de productos lácteos. Estos péptidos tienen acción inhibitoria sobre el enzima convertidor de la angiotensina (IECA) que impide la formación de angiotensina II, un potente vasoconstrictor, evidenciándose clínicamente su eficacia en la disminución de la presión arterial (Ricci et al, 2010). Otra molécula funcionalmente activa con un gran potencial de desarrollo es el Ácido 5 γ -Amino Butírico o GABA que ha demostrado sus efectos hipotensores en modelos animales (Hayakawa et al, 2004), así como en ensayos de intervención humana. Este aminoácido actúa a nivel cerebral como neurotransmisor de tipo inhibitor uniéndose a receptores específicos de las 10 membranas plasmáticas tanto en procesos neuronales pre-sinápticos como en post-sinápticos. La función del GABA como reductor de la presión arterial no reside en una respuesta vasodilatadora de las arterias, sino en la inhibición de la liberación de noradrenalina a través de la activación en los receptores pre-sinápticos. La noradrenalina es liberada por la médula suprarrenal en el torrente 15 sanguíneo como una hormona y también es un neurotransmisor en el sistema nervioso central y sistema nervioso simpático. Las acciones de la noradrenalina se llevan a cabo a través de la unión de los receptores adrenérgicos, los cuales se activan y producen una respuesta de vasoconstricción y una subida de la presión arterial al aumentar el tono 20 vascular. Al inhibir el GABA la liberación de noradrenalina se contrarrestan los efectos citados. En el ensayo de intervención humana de Shimada et al. (2009) se utilizó un suplemento dietético de algas rico en GABA y en el de Inoue et al. (2003), leche fermentada conteniendo GABA. En este último trabajo, una dosis de 10-12 mg/día de GABA reducía significativamente la presión sistólica y 25 diastólica en pacientes hipertensos.

Del GABA también se han estudiado sus efectos tranquilizantes (Guin et al., 2003), antidepresivos (Okada et al., 2003), beneficiosos para tratamientos de alcoholismo (Oh et al., 2003) y para el sistema inmune (Oh y Oh, 2003). Otros trabajos han demostrado que el GABA podría ayudar a incrementar la 30 concentración de hormonas de crecimiento en plasma y la tasa de síntesis de proteína en el cerebro (Tujioka et al., 2009). Además, en los últimos estudios consideran el GABA como un potente segregador de insulina en el páncreas

(Adeghate et al., 2002) lo que podría ayudar a prevenir estados de diabetes. El GABA es calificado, por tanto, como un eficaz componente bioactivo para su uso en alimentos, así como en productos farmacéuticos por sus numerosas propiedades demostradas.

- 5 La aplicación del GABA como ingrediente funcional ha sido estudiada en una gran variedad de productos, fundamentalmente en Oriente, donde existe gran multiplicidad de vegetales fermentados (Li y Cao, 2009), habiéndose desarrollado incluso técnicas de optimización para la síntesis del mismo (Lu et al., 2008). En uno de los escasos trabajos sobre este compuesto realizados en
- 10 Europa, algunas BAL aisladas de quesos muestran una buena síntesis de GABA, concretamente de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* (Siragusa et al., 2007), cuyo campo aplicativo ha sido la elaboración de masas ácidas para su empleo en panificación (Rizzello et al., 2008).

El empleo de masa agria, masa madre o *sourdough* para la fabricación del pan

15 es una práctica panadera muy antigua, actualmente generalizada a aquellos países que utilizan la harina de trigo y centeno para elaborar productos, sobretudo en países como Francia, Alemania e Italia. Desde tiempos remotos la masa madre ha sido conocida por su capacidad de mejorar la calidad y la conservación del pan (Decock y Capelle, 2005). Los ácidos orgánicos

20 producidos, fundamentalmente láctico y acético, afectan al gluten y a las fracciones del almidón. Adicionalmente, la bajada del pH asociada con la producción de ácidos causa un incremento de la actividad de las proteasas y amilasas, favoreciendo la reducción del envejecimiento y generando gran cantidad de aminoácidos que, a través del metabolismo de la levadura y/o

25 bacterias lácticas, se convertirán en alcoholes y cetonas con elevado valor aromático (Gäntzle et al., 2008). Además de mejorar la textura del pan, desde el punto de vista nutricional, la fermentación de la masa madre tiene como resultado un incremento de la biodisponibilidad de los minerales presentes y una reducción del contenido de fitatos. Estos datos, hacen que la masa madre

30 esté muy indicada en los panes integrales por su alto contenido en estas sustancias que limitan la absorción mineral por el organismo. También cabe destacar que los panes ácidos dan lugar a un Índice Glicémico (IG) menor que

los panes convencionales debido al mayor tiempo de tránsito en el estómago y a una mayor interacción entre almidón y gluten (Fardet et al., 2006).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo de bacterias Gram positivas, cocos o bacilos inmóviles anaeróbicos aerotolerantes o
5 microaerófilos, acidófilos y tolerantes a la sal. Su fuente de energía deriva exclusivamente de la fermentación de azúcares, de la que obtienen, ácido láctico como principal producto final. Estas bacterias son realmente útiles en la fabricación de alimentos fermentados o materias primas como frutas, vegetales, granos de cereal, carne y leche (Hufner et al., 2007) en los cuales
10 contribuyen al sabor, la textura y la vida útil del producto. Además su importancia está evidenciada por su consideración de microorganismos generalmente seguros (*Generally Regarded As Safe*, GRAS, en inglés) por la FDA (*Food and Drug Administration*) debido a su presencia en gran variedad de alimentos ya que contribuyen como flora saprófita de las superficies
15 mucosas humanas, favoreciendo la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, la reducción de colesterol en plasma y la modulación en el sistema immune (Holzapfel et al., 2001; Tsai et al., 2008). Las BAL han sido tradicionalmente clasificadas en diferentes géneros basados en las colonias, la morfología celular, la fermentación de azúcares, el
20 crecimiento a distintas temperaturas, la producción de ácido láctico, la habilidad de crecimiento en presencia de altas concentraciones de sal, la tolerancia acídica o los análisis en la pared celular (Kandler et al, 1986). Los géneros de bacterias lácticas identificadas en masas madres o sourdough son diversos, principalmente *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Entre las
25 BAL, las especies del género *Lactobacillus* son ampliamente usadas como probióticos promoviendo, independientemente del valor nutritivo, los efectos saludables de estos alimentos, especialmente en una amplia gama de productos lácteos fermentados, ya sean líquidos, como el kéfir, o densos y semisólidos como queso o yogurt.

30 La producción de GABA se origina por la descarboxilación irreversible del L-glutamato mediante la acción del enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa (GAD) que es dependiente de la molécula piridoxal 5'-fosfato o Vitamina B₆. La

enzima se encuentra ampliamente distribuida entre el reino eucariota y el procariota (Ueno H, 2000). Numerosos estudios han demostrado la presencia de GAD en algunas bacterias del ácido láctico y la resistencia que ofrece el GABA bajo condiciones acídicas (Cotter et al., 2003)

- 5 La adición química de GABA resulta poco natural y entraría dentro del campo farmacéutico, por lo que se hace necesario encontrar métodos innovadores para producir e incrementar las concentraciones de GABA en alimentos. La producción de GABA por parte de las BAL resulta de especial interés para su aplicación en alimentos o ámbitos biotecnológicos.

10

Antecedentes de la invención

- Gracias al vasto conjunto de vegetales fermentados que caracteriza el mercado asiático, las bacterias del ácido láctico han sido allí ampliamente
- 15 estudiadas en base a su producción de GABA. Los más recientes: un grupo de Myoung-hee Jeon de Korea patentó en Abril de 2012 un método para el incremento de GABA mediante la fermentación de las habas de soja (*Manufacturing method for fermented soybeans having increased gamma-aminobutyric acid content*) y en 2011, en Japón, los autores Go Monma y
- 20 Hayakawa patentaron un método para la producción de comida y bebida rica en ácido gamma aminobutirico así como las comidas y bebidas obtenidas por este método, consistente en la producción de GABA en productos de tomate procesados basados en el contenido de azúcar fermentable (*Production method of food and beverage products with high content of gamma-aminobutyric acid and food and beverage products with high content of GABA*).
- 25 También en Japón el grupo de Yoshiki Hanya patentó recientemente (Julio de 2009) algunas especies de bacterias ácido lácticas capaces de producir GABA en coexistencia con otras bacterias lácticas y en presencia de sal común en el medio, en concreto la cepa *Lactobacillus renmini* aislada de aceite de soja refinado (*Lactic acid bacterium capable of producing gamma-aminobutyric acid*). En el estudio *Food material including much GABA and method of manufacturing the same* patentado en el mismo país por Ichijo et al., 2005
- 30 propusieron un método para la producción de una matriz alimentaria elaborada

a base de habas de soja ricas en GABA por acción descarboxiladora de las bacterias ácido lácticas. Otras patentes coreanas hacen referencia a alimentos ricos en GABA y sus métodos de producción, por ejemplo, la que usan glutamato a partir de algas (*Method for preparing GABA using natural glutamate from seaweed through fermentation*), para la elaboración de Kimchi 5 (*Strain for high gamma-aminobutyric acid production, a starter for kimchi fermentation and a method for producing*) o a partir de levadura con habilidad productora de GABA (*Method for production gamma-aminobutyric acid-containing food and yeast having high ability to produce gamma-aminobutyric acid*). También se ha patentado la tecnología de incremento de GABA y otros 10 aminoácidos en alimentos, incluyendo el pan, por medio de la adición de cereales germinados (*Kihara et al.: Foods containing large amount of functional components and method of producing the same*).

En Europa, recientes estudios del GABA han sido publicados y, especialmente, 15 en Italia la patente internacional encabezada por Giuliani Giammaria mostró el posible uso de la cepa *Lactobacillus plantarum* DSM 19563 para la fermentación del mosto de uva y su producción de GABA para ámbitos agroindustriales y farmacéuticos (*Process for the preparation of gamma-amino butyric acid by the use of lactic acid bacteria on agro-and food industry surplus*). 20

Explicación de la invención

En base a los conocimientos de los efectos beneficiosos del GABA y de los 25 múltiples estudios que lo han corroborado, en este trabajo se demuestra la alta capacidad de producción de ácido gamma aminobutírico por parte de las cepas CECT 8183, CECT 8181 y CECT 8182 de *Lactobacillus brevis*, que han sido aisladas de quesos españoles artesanales.

Los alimentos caseros fermentados con un periodo medio o largo de curación, 30 como los quesos, contienen más cantidad de aminoácidos que los de producción industrial debido a la alta proporción de proteína en la materia

prima, la actividad de las enzimas proteolíticas y los microorganismos involucrados en el proceso (Yvon y Rijnen, 2001).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son esenciales para la producción de alimentos fermentados. Su presencia en la materia prima es bien conocida, incluso sin ser añadidas (10^2 - 10^3 ufc/gramo), dominando rápidamente la fermentación. Su habilidad para disminuir el pH de la matriz alimentaria produciendo ácidos a través de la fermentación de los carbohidratos permite obtener un producto final con notables características organolépticas. Las prácticas modernas de fabricación implican el uso de *starters* comerciales permitiendo una producción a gran escala sin riesgos. No obstante, su uso conlleva a la obtención de productos con un perfil microbiológico muy estandarizado y menos variable en comparación con los que han sido fermentados de forma natural.

Las ventajas que supone esta invención engloban la posibilidad de emplear sustratos de fermentación natural a bajo coste permitiendo el uso de estos microorganismos y su biosíntesis de GABA, un tipo de fermentación que permite un alto valor fisiológico enriquecido de forma natural en GABA con la ventaja de poder ser conservado por largos periodos de tiempo y la posibilidad de crear un alimento potencialmente funcional apto para el consumo humano.

Materiales y métodos

Medios y reactivos

- 5 Solución de agua de peptona (APT) y Tween 80 (5 g/l) (AES Chemunex): El agua de peptona tamponada compuesta por peptona pancreática de carne (10 g/l), fosfatos disódico anhidro (3.57 g/l) y monopotásico (1.5 g/l) y cloruro de sodio (5 g/l) se usó como diluyente. El tween 80 o polisorbato formado por diferentes ésteres oleicos facilitó la homogeneización de la muestra al tratarse
- 10 de productos con alto contenido graso.
- MRS agar (Biokar Diagnostics): El agar Man-Rogosa-Sharpe usado para el crecimiento y recuento de bacterias ácido lácticas mesófilas en productos lácteos y otros alimentos se compone de polipeptonas (10 g/l), extracto de carne (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), glucosa (20 g/l), Tween 80 (1.08 g/l),
- 15 fosfato dipotásico (2 g/l), acetato de sodio (5 g/l), citrato de amonio (2 g/l), sulfato de magnesio (0.2 g/l), sulfato de manganeso (0.05 g/l) y agar (15 g/l). El medio se preparó a partir de MRS deshidratado diluido en agua destilada, se llevó a ebullición agitando hasta su completa disolución y se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- 20 Ringer ¼ (AES Chemunex): Para obtener la solución de Ringer se disolvió un comprimido en 500 ml de agua destilada, que se distribuyó en frascos y se autoclavarón 15 minutos a 121°C. El ringer se usó como diluyente isotónico.
- El medio de reacción para la producción de GABA fue compuesto de L-Glutamato monosódico hidratado (Bioreactivo con pureza 99-100%) que se
- 25 usó como precursor de la producción de GABA y de Tween 80 o polisorbato como estimulador enzimático. Ambos fueron adquiridos de Sigma Aldrich.
- El cloruro de sodio de Panreac se empleó para el lavado de pellet.
- La solución de glutamato y Tween 80 y la sal fueron autoclavadas a 121°C durante 15 minutos antes de ser usadas.
- 30 Para el indicador ácido base se usaron los reactivos rojo de metilo (ácido rojo 2*-2(-4-Dimetilaminofenilazo) ácido benzoico), azul de metileno (cloruro de tretametiltionina* 3,7-bis (dimetilamino) fenazationio) obtenidos de Sigma y etanol absoluto que fue adquirido de Panreac.

Screening

En este estudio se realizó un *screening* para bacterias ácido lácticas de más de 65 quesos preferentemente artesanales que representaban los diferentes tipos y marcas del mercado español.

Para el aislamiento y crecimiento de las cepas, se preparó una dilución 1/10 de la muestra pesando 10 gramos y mezclándolos con 90 ml de agua de peptona y Tween 80. La suspensión fue homogeneizada mediante el homogeneizador *stomacher* (UIL Instruments HO001) y se realizaron 3 diluciones decimales de cada muestra. Un mililitro de una de las diluciones fue sembrado en una placa de petri estéril a la que previamente se añadió 15 ml de MRS agar y se dejó enfriar. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 30°C en condiciones de anaerobiosis (BD GasPak Ez Container Systems).

15 **Ensayo cualitativo de la actividad GAD**

Tras 48 h de incubación se tomaron un mínimo de 10 colonias aisladas de cada producto y a continuación se evaluó la actividad GAD de cada una de ellas mediante el Método del Indicador de pH (PIM) (Yang et al., 2006). El Indicador de pH se preparó mezclando en 1:1 (v/v) rojo de metilo (0.2%) y metileno de azul (0.1%) en etanol. A pH<5.4 el indicador es de color magenta mientras que a pH>5.4 el color es verde. Una vez obtenido crecimiento en MRS a 30°C, los tubos fueron centrifugados a 5000 g durante 15 min, los pellets se lavaron tres veces en una solución de NaCl al 0.85% y se resuspendieron en 10 veces (p/v) en una solución de L-glutamato monosódico (10 mM que contenía 0.1mM de Tween 80) ajustada a un pH de 4.7. Los tubos se dejaron incubar a 37°C durante 1 a 4 días en los que el sobrenadante era analizado cualitativamente a diario con el indicador. Tras la adición de unas gotas del complejo la cepa mostraba actividad GAD si el color cambiaba de magenta a verde.

Como población control para los ensayos se tomó la cepa contrastada *Lactobacillus brevis* NBRC 12005 (Ueno et al., 1997) procedente de la

Biological Resource Center (NITE) de Japón conocida por su alta actividad de la enzima GAD, con la que se estableció la concentración óptima de L-glutamato para obtener el mayor rendimiento de conversión a GABA. Tras las pruebas con diversas concentraciones (entre 0.01 y 0.5 mM) y dos
5 temperaturas de incubación (30 y 37 °C) se observó que 0.01 mM y 37°C eran las condiciones ideales para la realización de esta prueba pese a que la biomasa bacteriana crecía indistintamente a ambas temperaturas.

Tras comprobar la actividad GAD de las 10 colonias de BAL aisladas de todos los producto analizados, se obtuvieron un total de 12 cepas positivas que
10 fueron identificadas y conservadas en forma de cultivo puro en criobolas a -80°C. De ellas, se seleccionaron 3, las denominadas como cepas 77, 89 y 91 ya que según los análisis que se describen a continuación, superan las prestaciones de la cepa control para síntesis de GABA en las condiciones de cultivo planteadas.

15

Caracterización fenotípica de las cepas

Para la identificación fenotípica mediante el perfil fermentativo de las 12 cepas se usaron las galerías API 50CHL o Índice de Perfil Analítico (Biomérieux,
20 Francia). Cada colonia aislada se suspendió e inoculó en cada pocillo de la galería. Durante la incubación (48h a 30°C), el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. Los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 2 corresponden únicamente a las cepas CECT 8183, CECT 8181, y CECT 8182, y constituyen el perfil
25 bioquímico en base a las fermentaciones de los 50 carbohidratos que componen la galería. Estos patrones fermentativos permitieron la caracterización del microorganismo con la ayuda del Software informático de identificación API WEB.

30

Caracterización genotípica de las cepas

A fin de asegurar los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica se procedió a secuenciar el ARN ribosómico 16S de las cepas a fin de obtener su identificación. Para ello se extrajo el ARN_r bacteriano empleando un método automatizado basado en el uso de sílica magnética y se midió su concentración y pureza espectrofotométricamente. A continuación se realizó la amplificación mediante PCR del ADN_r 16S con el uso de marcadores universales en un termociclador (7300PCR System de Applied Biosystems). Posteriormente se verificó el amplificado en gel de agarosa y se purificó con el uso de kits comerciales. Finalmente se secuenció el fragmento de amplificación y se procedió a su análisis e identificación por comparación con bases de datos universales (NCBI).

Ensayos para la determinación de producción de GABA

Con el fin de evaluar la producción de GABA en una masa madre de harina integral por parte de las cepas, se procedió a recuperar biomasa bacteriana de las criobolas haciéndolas crecer en MRS durante 48 h a 30°C. Tras el crecimiento, el pellet se centrifugó y lavó con Ringer ¼. La suspensión obtenida de cada una de estas cepas fue inoculado en un matraz de 500 ml en un medio no optimizado constituido finalmente por un 20% de harina integral y un 80% de agua destilada cuidando las condiciones estériles. Después de 24 h incubando a 30°C se determinó la concentración de GABA, se hizo un seguimiento del pH (Fig. 2) y una evaluación del recuento microbiano de BAL al inicio y al final de la incubación (Fig. 3). El análisis se realizó por triplicado bajo la comparativa de un blanco, que contenía un 20% de harina integral y un 80% de agua.

Inicialmente no se realizó ningún ajuste de pH en los medios, por lo que los valores obtenidos corresponden a la evolución natural de la fermentación en la disolución de harina de las cepas ocurrida en las 24 h de incubación.

Tras preparar los frascos con el medio e inocular la cepa a ensayar, se extrajo una alícuota de 1 ml y se realizaron diferentes diluciones en agua de peptona.

1 ml de cada dilución fue sembrado en una placa de petri estéril a la que se añadió 15 ml de MRS agar. Tras dejar enfriar, las placas fueron incubadas a 30°C en anaerobiosis (BD GasPak Ez Container Systems) durante 48 h para realizar el recuento. Tras las 24 h de incubación de la disolución en harina, se obtuvo el recuento bacteriano final bajo el mismo procedimiento.

Tabla 1. Origen de las cepas aisladas, variación de pH y concentración de GABA obtenida después de 24h en una disolución de harina del 20%.

ESPECIE	ORIGEN	pH inicial screening	pH final screening	Concentración de GABA (mM) en disolución de harina al 20%
Control L.brevis 12005	NITE	4,7	6,8	0,83
CECT 8183	Queso de cabra	4,7	6,8	0.96
CECT 8181	Queso de oveja	4,7	7,1	0,94
CECT 8182	Queso de cabra	4,7	6,3	0,99

10

Determinación y estimación cuantitativa de GABA

La extracción de GABA de los medios se realizó centrifugando a 20.000 g durante 15 min a 4°C. Tras filtrar una alícuota del sobrenadante, se realizó una derivatización en precolumna mediante la metodología del reactivo 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinil carbamato (AccQTag) de Waters para poder cuantificar a través del detector de absorción ultravioleta en Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en fase reversa. Para derivatizar, 10 µl de muestra se mezclaron con 70 µl de tampón borato Acc Q fluor (Waters) que tras homogeneizar en vórtex unos segundos se le añadió 10 µl del reactivo reconstituido AccQ fluor. La mezcla fue nuevamente homogeneizada y tras un minuto de reposo a temperatura ambiente, se calentó 10 min en un bloque

20

calentador a 55°C para finalmente añadir 100 µl del diluyente cromatográfico A e inyectar en el cromatógrafo de gradiente modelo Waters 600 consistente en un módulo controlador, una bomba Waters Delta 600 y un inyector automático (Waters 717 plus). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una
5 columna C18 AccQTag de Waters (4 µm 3,9 x 150 mm) que estuvo mantenida en un horno a temperatura constante (37°C). La fase móvil consistió en una mezcla de diluyente A (concentrado comercial de una mezcla de solución tampón fosfato-acetato y acetonitrilo) y acetonitrilo, con un flujo de 1 ml/min.

10 Descripción de las figuras

Como complemento a la descripción se muestran unas figuras con tablas y gráficos de los diferentes datos referentes a las tres cepas.

15 **Figura 1.-** Concentraciones de GABA (milimoles/Litro) obtenidas con las distintas cepas.

Figura 2.- Variación de pH en cultivo de harina diluida (1:5) a 30°C.

Figura 3.- Logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (log cfu/ml) respecto al tiempo (horas) en cultivos de harina integral
20 diluida (1:5) a 30°C.

Figura 4.- Muestra tres gráficos del crecimiento (log cfu/ml) y acidificación (pH) para las diferentes cepas.

Resultados

25 Identificación

La caracterización genotípica de las bacterias estudiadas da como resultado que las numeradas por la Colección Española de Cultivos Tipo con los números CECT 8183, CECT 8181 y CECT 8182 corresponden a la especie *Lactobacillus brevis*, aunque en las pruebas bioquímicas se evidenció que
30 corresponden a cepas distintas, con algunas variantes en sus perfiles fermentativos. Las secuencias del 16S ARNr de las diferentes cepas se muestra en el Anexo 1.

Screening

Los rápidos cambios de color y los altos valores de pH observados permitieron distinguir entre las cepas con alta actividad GAD de las de baja actividad. Tal como se ha comentado anteriormente, las cepas seleccionadas corresponden a una alta actividad de conversión, que en el medio utilizado de disolución de harina, son superiores a la cepa 12005 utilizada como control.

Los resultados indicaron que el rápido incremento de pH y cambio de color en el medio con L-glutamato y Tween 80 de las cepas de *Lactobacillus brevis* fue debido a la descarboxilación irreversible del L-glutamato por la enzima GAD mientras que las ligeras variaciones observadas en otras cepas podían ser atribuidas al uso de pequeños péptidos presentes en el medio. Por tanto, el aumento de pH por encima de 5.4 reflejó directamente la actividad GAD de las cepas.

15

Concentración de GABA

La gráfica de la figura 1 muestra las concentraciones de GABA obtenidas de las cepas CECT 8183, CECT 8181 y CECT 8182 de *Lactobacillus brevis* en disolución de harina, alcanzando valores superiores a la cepa control. Se observó cómo estas concentraciones presentan cierta correlación con las pruebas del *screening* para la actividad GAD, siendo en general las cepas con alta actividad las que produjeron concentraciones de GABA más elevadas.

20

Variación de pH

La figura 2 muestra el descenso gradual del pH durante las 24h de incubación de las cepas CECT 8183, CECT 8181 y CECT 8182 de *Lactobacillus brevis* respecto al blanco estando el pH inicial alrededor de 6 y que tras las 24h se alcanza valores por debajo de 4 lo cual significó que 24 horas fue tiempo suficiente para que se completara la fermentación.

30

Cinética de crecimiento

El crecimiento bacteriano para las diferentes cepas CECT 8183, CECT 8181 y CECT 8182 de *Lactobacillus brevis* se muestra muy similar y con poca variación para las distintas cepas (Figura 3). Esto se debe al poco tiempo de incubación al que las muestras fueron sometidas. El blanco, en cambio, mostró también crecimiento muy intenso debido a la carga natural de BAL que, de por sí, contiene la harina.

En la siguiente tabla se muestran diferentes datos de identificación de las cepas.

Tabla 2. Identificación bioquímica API. +: positivo, -: negativo; d: reacción débil; (1): 5% de las cepas positivas; (2): 7% de las cepas positivas; (3): 13% de las cepas positivas; (4): 1% de las cepas positivas.

Carbohidrato	Cepas		
	CECT 8183	CECT 8181	CECT 8182
Glicerol	-	-	-
Eritritol	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-
L-Arabinosa	-	-	-
D-Ribosa	+	+	+
D-Xilosa	+	+	+
L-Xilosa	+	+	+
D-Adonitol	-	-	-
Metil-βD-xilopiranosida	-	-	+ (1)
D-Galactosa	-	-	+
D-Glucosa	+	+	+
D-Fructosa	+	+	+
D-Mamnosa	+	+	+
L-Sorbosa	-	-	-
L-Rhamnosa	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
D-Manitol	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-
Metil-αD-manopiranosida	-	-	-
Metil-αD-glucopiranosida	-	-	-
N-acetilglucosamina	+	+	-
Amigdalina	+	+	+

Arbutina	-	-	-
Esculina citrato férrico	+ (2)	+ (2)	+ (2)
Salicina	+	+	+
D-Celobiosa	-	-	-
D-Maltosa	-	-	-
D-Lactosa	+ (3)	+ (3)	+ (3)
D-Melibiosa	+	+	+
D-Sacarosa	+	+	+
D-Trehalosa	-	-	-
Inulina	-	-	-
D-Melezitosa	-	-	-
D-Rafinosa	-	-	-
Almidón	-	-	-
Glicógeno	-	-	-
Xilitol	-	-	-
Gentiobiosa	-	-	-
D-Turanosa	-	-	-
D-lixosa	-	-	-
D-Tagatosa	-	-	-
D-Fucosa	-	-	-
L-Fucosa	-	-	-
D-Arabitól	-	-	-
L-Arabitól	-	-	-
Gluconato potásico	+	d	+
2-cetogluconato potásico	+	-	-
5-cetogluconato potásico	+	+	+

Reivindicaciones

Nuevas cepas de la especie *Lactobacillus brevis* para su utilización en masas
5 madres panarias caracterizadas porque:

1. Las cepas CECT 8183, CECT 8181 y CECT 8182 son de *Lactobacillus brevis*.
- 10 2. Uso de las cepas según la reivindicación 1 para la fabricación de pan como alimento funcional a través de la inclusión de masa madre o *sourdough* producida por medio de estas cepas.
3. Uso de las cepas según la reivindicación 1 para la fabricación de cualquier producto alimenticio considerado alimento funcional o complemento nutricional y/o farmacéutico mediante la fuente
15 concentrada de GABA para su ingestión o administración oral.
4. Uso de las cepas según la reivindicación 1 para la producción de GABA mediante un proceso que comprende los siguientes apartados:
 - a) Propagación en un medio de cultivo siendo éste Man-Rogosa-Sharpe de las cepas de *Lactobacillus brevis* CECT 8183, CECT
20 8181 y CECT 8182 a 30°C durante 24h.
 - b) Resuspensión de la biomasa obtenida en sustratos o disoluciones harinosas.
 - c) Inoculación de los sustratos o disoluciones y posterior fermentación.

25

Lista de Secuencias

- 5 <110> Europastry,S.A.
- <120> Nuevas cepas de la especie *Lactobacillus brevis* para la utilización en masas madres panarias.
- 10 <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 507
- <212> RNA
- <213> *Lactobacillus brevis* CECT 8183
- 20 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | |
|----------|------|---------|-------|--------|---------|--------|--------|-------|---------|-----|-----|
| catgccta | aat | gcaagc | ttccg | ttgaa | tgacgtg | cctt | gcactg | attt | caacaat | gaa | 60 |
| gcgagt | ggcg | aactg | gtgag | taacac | gtgag | taacac | gtgag | gaaat | ctg | ccc | 120 |
| tgaaac | aggg | tgctaa | tacc | gtataa | caaac | aaaat | ccg | ca | tgga | ttt | 180 |
| gcttcg | gcta | tcactt | ctg | atgat | cccc | ggcgt | tatt | ag | ttt | g | 240 |
| ccacca | agac | gatgata | cgt | agccg | ac | ctg | agagg | g | ta | a | 300 |
| cacggc | ccaa | actccta | c | gaggc | ag | cag | tagg | g | aat | ct | 360 |
| gatggag | caa | tgccg | c | gtga | aga | aagg | gtttc | gg | ctc | t | 420 |
| aagaac | acct | ttgag | g | ta | g | ta | aagg | gtt | g | ta | 480 |
| taactac | gtg | ccagc | ag | ccc | gcg | g | ta | a | ag | cc | 507 |
- <210> 2
- 35 <211> 516
- <212> RNA
- <213> *Lactobacillus brevis* CECT 8181
- 40 <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-----|-----|----|-----|
| catgccta | aat | gcaagt | cgaac | gagct | tccg | ttg | aat | gacgt | g | ctt | g | 60 |
| aacaat | gaag | cgagt | ggcga | actg | gtg | agt | aacac | gtg | gg | g | g | 120 |
| gataac | acct | gaaac | aggt | gcta | atacc | tataa | caaca | aatcc | g | ca | g | 180 |
| tgaaag | gtg | cttcg | g | ctat | cactt | ctg | g | tgat | ccc | g | g | 240 |
| ggtaa | aggg | ccac | aag | acg | atgata | c | g | g | g | g | ta | 300 |
| ggact | gag | acgg | ccaaa | ctccta | c | g | g | ag | g | ca | g | 360 |
| cgaag | ctg | atgg | agcaat | gccg | c | g | g | ta | g | ag | g | 420 |
| ttgtt | aaaga | agaac | acct | tgag | ag | ta | aagg | ttg | ac | g | g | 480 |
| agccac | ggct | aactac | gtg | cagc | ag | ccc | gcg | g | ta | a | ag | 516 |
- <210> 3

<211> 516

<212> RNA

5

<213> *Lactobacillus brevis* CECT 8182

<400> 3

10	catgcctaat	acatgcaagt	cgaacgagct	tccgttgaat	gacgtgcttg	cactgatttn	60
	aacaatgaag	cgagtggcga	actggtgagt	aacacgtggg	aaatctgccc	agaagcaggg	120
	gataacactt	ggaaacaggt	gctaataccg	tataacaaca	aaatccgcat	ggattttggt	180
	tgaaaggtgg	cttcggctat	cacttctgga	tgatcccgcg	gcgtattagt	tagttggtga	240
	ggtaaaggcc	caccaagacg	atgatacgtg	gccgacctga	gagggtaatc	ggccacattg	300
15	ggactgagac	acggcccaaa	ctcctacggg	aggcagcagt	agggaatcct	ccacaatgga	360
	cgaaagtctg	atggagcaat	gccgcgtgag	tgaagaaggg	tttcggctcg	taaaactctg	420
	ttgttaaaga	agaacacctt	tgagagtaac	tgttcaaggg	ttgacggtat	ttaaccagaa	480
	agccacggct	aactacgtgc	cagcagcccg	cggtaa			516

20

Resumen

Nuevas cepas de la especie *Lactobacillus brevis* para la utilización en masas madres panarias.

La presente invención se refiere al uso de las cepas CECT 8183, CECT 8181 y
5 CECT 8182 de *Lactobacillus brevis*, para la producción de GABA, de medios enriquecidos en GABA, para la fabricación de alimentos funcionales, complementos nutricionales y/o farmacéuticos, así como un método para la producción de GABA en masa madre ácida o *sourdough* mediante dichas cepas.

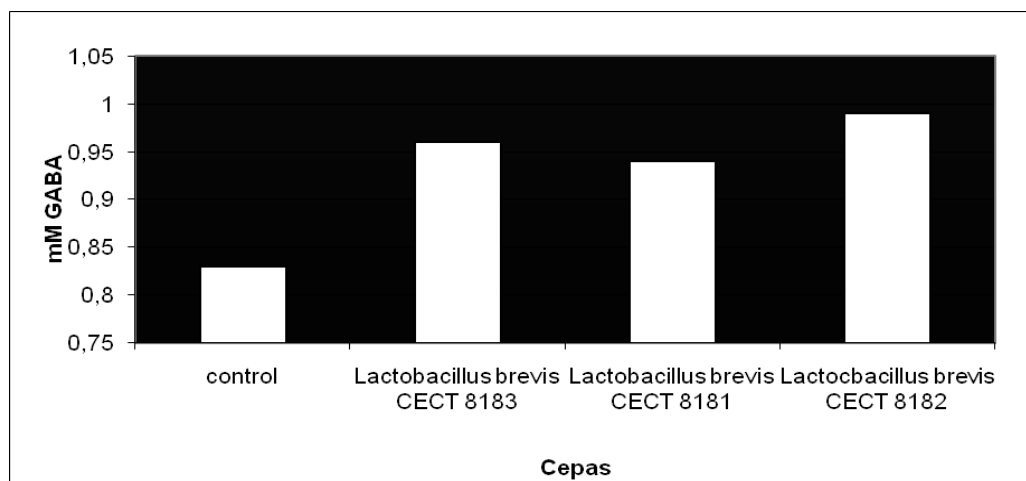


Fig 1.

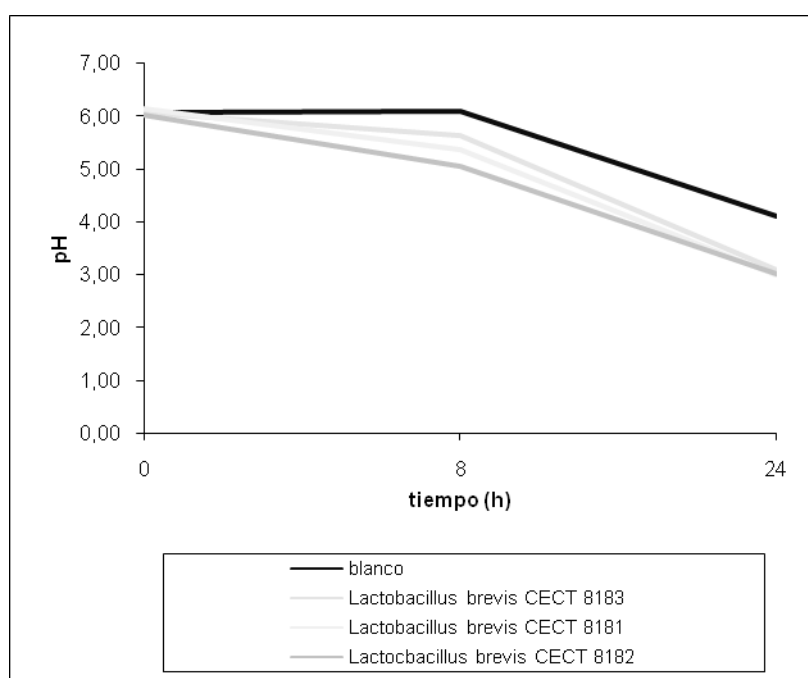


Fig. 2.

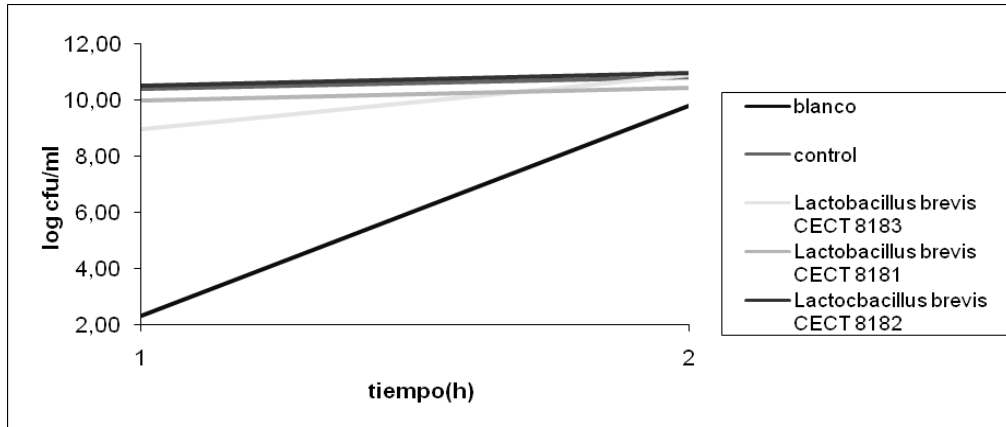


Fig. 3.

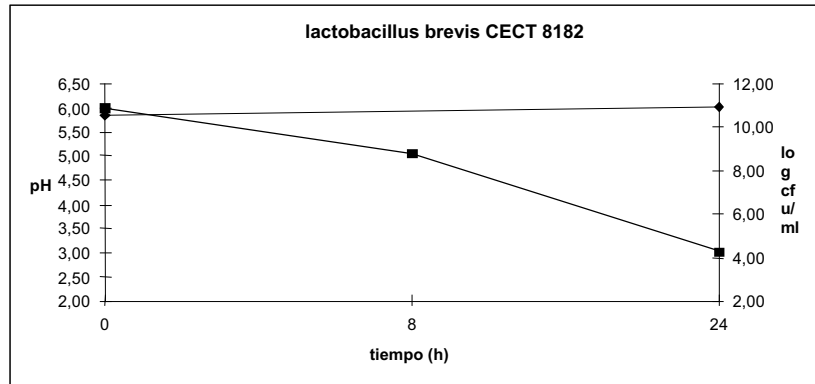
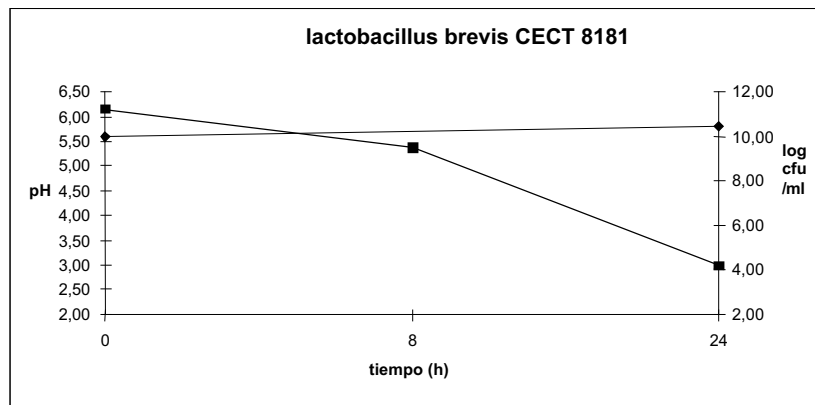
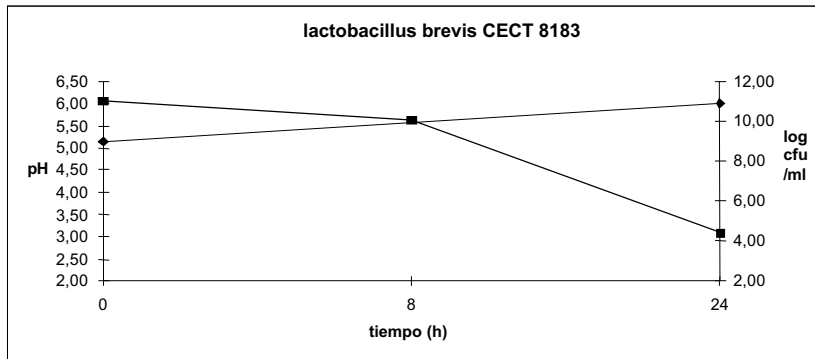


Fig. 4.

4.6 A Multistrategic Approach in the Development of Sourdough Bread Targeted Towards Blood Pressure Reduction

Elena Peñas, Marina Diana, Juana Frías, Joan Quílez, Cristina Martínez-Villaluenga
Plant Food for Human Nutrition (2014), *enviado*

Índice de impacto (2014): 2,416

Categoría: Food Science and Technology, 27 de 123 (2º cuartil)

Resumen:

El aumento de la hipertensión está llevando a la industria alimentaria hacia el desarrollo de alimentos innovadores con efectos antihipertensivos. El objetivo fue estudiar el efecto de un pan experimental reducido en sodio y con un 21% de adición de masa madre de trigo integral (producida por *Lactobacillus brevis* CECT 8183) en cuanto a composición nutricional, el contenido de GABA y péptidos en el pan. Las actividades inhibitorias de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y las antioxidantes también fueron evaluadas. Los resultados mostraron que el GABA y los péptidos <3kDa en el pan experimental fueron 7 y 3 veces mayores, respectivamente, comparado con el pan control. También, la actividad inhibitoria de la ACE y la antioxidante de la fracción peptídica <3kDa del pan experimental fue 1,7 y entre 2,6 y 3 veces mayores que el control. Por tanto, la combinación de la reducción del contenido de sodio junto con el enriquecimiento de componentes bioactivos en la elaboración del pan puede abrir interesantes perspectivas para el desarrollo de alimentos que puedan ayudar a reducir la presión arterial.

A Multistrategic Approach in the Development of Sourdough Bread Targeted Towards Blood Pressure

Reduction

E. Peñas,¹ M. Diana,^{2,3} J. Frias,¹ J. Quílez,^{2,4,5} C. Martínez-Villaluenga^{1,*}

¹Department of Food Characterization, Quality and Safety; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

²Technology Department, Europastry, S.A., Barcelona, Spain

³Nutrition and Food Science Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

⁴Human Nutrition Unit, School of Medicine, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

⁵CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

*Corresponding author: c.m.villaluenga@csic.es; Tlf: +34 912587601; Fax: +34 915644853

Abstract

Rising prevalence of hypertension is pushing food industry towards the development of innovative food products with antihypertensive effects. The aim was to study the effect of reduced sodium content and 21% addition of wholemeal wheat sourdough (produced by *Lactobacillus brevis* CECT 8183 and protease) on proximate composition, GABA and peptide content of wheat bread. Angiotensin converting enzyme I (ACE) inhibitory and antioxidant activities were also evaluated. Sodium replacement by potassium salt did not affect chemical composition and biological activities of bread. In contrast, GABA and peptides <3 kDa contents in sourdough bread (SDB) were 7 and 3 times higher, respectively, than the observed in control. ACE inhibitory and antioxidant activities of the peptide fraction < 3 kDa from SDB was 1.7 and 2.6-3.0 times higher than control. Therefore, the combination of reduced sodium content with enriched concentrations of bioactive compounds in bread making may provide interesting perspectives for development of innovative breads towards blood pressure reduction.

Keywords: wheat bread, hypertension, sodium reduction, sourdough, antioxidant, angiotensin I converting enzyme

28 **Abbreviations** ACE angiotensin I converting enzyme; BP blood pressure; CB conventional wheat bread; GABA γ -
29 aminobutyric acid; LAB lactic acid bacteria; LSB low-sodium wheat sourdough bread; MALDI-TOF matrix assisted
30 laser desorption ionization time of flight; ORAC oxygen radical absorbance capacity; SDB low sodium wheat
31 sourdough bread; SD sourdough; SDS-PAGE Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis

32 **Introduction**

33 Hypertension is a public health problem associated with cardiovascular complications affecting 25% of adult
34 population worldwide [1]. Reduction of sodium intake can shift the population distribution of hypertension [2].
35 Similarly, the consumption of healthy foods that contain bioactive compounds with antihypertensive activity may
36 result effective in improving health outcomes of people with raised blood pressure (BP). Moreover, an increased
37 intake of foods rich in antioxidants may ameliorate oxidative stress, and therefore, prevent from the development
38 of hypertension and other cardiovascular complications [3]. Food industry must have an active role to solve this
39 societal challenge through innovation focused on the development of foods with reduced sodium content and with
40 antihypertensive and antioxidant properties. This approach will provide consumers with healthy foods that help in
41 the prevention of hypertension.

42 Bread is considered to be the foodstuff that provides the most dietary salt (NaCl), therefore it is one of the key
43 targets in any salt reduction strategy. A decrease in the salt content of bread is possible by replacing partially the
44 salt content by other salts, mainly of potassium [4] without detrimental effects in terms of both technology and
45 sensory acceptance [5]. Healthy and organoleptic features of bread can be additionally improved through
46 sourdough fermentation by lactic acid bacteria (LAB) [6,7]. Recent studies have shown that LAB metabolism may
47 produce new nutritionally bioactive compounds with antihypertensive activity such as γ -aminobutyric acid (GABA),
48 the main inhibitory neurotransmitter in the mammalian nervous system, that is well known for lowering BP and its
49 diuretic and tranquilizer effects [8,9]. Angiotensin I converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and antioxidant
50 peptides may be also synthesized by LAB during sourdough fermentation [10-12]. Inhibition of ACE hinders the
51 formation of angiotensin II, a potent vasoconstrictor that results in BP decrease [13]. Antioxidant peptides may
52 delay oxidative processes *in vivo* through radical scavenging, chelation of metal ion, inhibition of lipid peroxidation,
53 etc [12]. To the best of our knowledge no literature data deal with the development of a functional wheat bread
54 from an innovative multi-strategic approach consisting of partial replacement of salt by potassium citrate, protease
55 addition and sourdough fermentation by *Lactobacillus brevis* CECT 8183 strain (isolated from Spanish cheese)

56 with proven high GABA-producing ability [14]. The effect of these approaches on nutritional composition, GABA
57 and peptides production with ACE-inhibitory and antioxidant activities was evaluated.

58 **Materials and Methods**

59 *Materials*

60 Wholemeal wheat, white wheat and roasted soybean flour were purchased from Harinas Polo (Zaragoza, Spain).
61 Protease enzyme was from Puratos S.A. (Groot-Bijgaarden, Belgium) and potassium citrate was purchased from
62 Quimidroga S. A. (Barcelona, Spain). Sourdough and the three types of bread were made at pilot scale. Each loaf
63 of bread was grated on a laboratory knife mill (Grandomix GM 200) at 7,000 rpm for 10 seconds and stored at -20
64 °C.

65 *Sourdough fermentation and bread preparation*

66 *Lactobacillus brevis* CECT 8183 isolated from an artisan Spanish cheese and with high proven capacity for GABA
67 synthesis [14] was used as a starter for the sourdough fermentation. Four cryobeads of the microorganism were
68 cultivated on Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth medium (AES Chemunex, Terrassa, Spain). After 48 h at 30
69 °C of incubation, the cells were recovered by centrifugation (10,000 x g for 15 min), washed twice in sterile water,
70 and re-suspended in a 10 µM pyridoxal 5-phosphate solution at the minimum cell density of log 8 CFU/ml. Whole
71 wheat flour (16.5%), soya flour (2%), protease (1.5%) and distilled water (80%) were used to prepare 5 L of
72 sourdough (the dough yield was 500) with a continuous speed mixer (100 rpm) in a bioreactor (Biostat A plus,
73 Sartorius, Germany) previously sterilized at 121 °C for 20 min. Sourdough fermentation was carried out at 30 °C
74 for 48 h. In order to enhance GABA production, pH was maintained at 4.5 by the continuous addition of 2.5 M
75 KHCO₃. At the end of fermentation, protease was inactivated by increasing the temperature to 70 °C for 2 min.
76 Sourdough fermentations were carried out ten times and analyzed in duplicate to check the GABA content.
77 Three types of bread (conventional wheat bread, CB; low-sodium wheat bread, LSB; low-sodium wheat sourdough
78 bread, SDB) were manufactured according to the formulation shown in Table 1. After kneading and make-up, the
79 bread dough was fermented at 27 °C for 90 min with a humidity level of 76%. Baking was carried out at 205 °C for
80 25 min.

81 *Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)*

82 Proteins in breads and sourdough were extracted following the procedure of Dupont et al. [15] and separated
83 under non-reducing conditions by SDS-PAGE on NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris gels in the XCell-sure lock

84 minicell system (Invitrogen, Madrid, Spain) at 200V for 35 min. Proteins were stained with SimplyBlue SafeStain
85 (Invitrogen), followed by destaining in deionized water. The molecular weights of poly- and oligopeptides were
86 determined by comparison with the molecular weight marker® solution Sharp Novex unstained standard
87 (Invitrogen).

88 *Chemical Analysis*

89 Proximate composition of breads and sourdough was determined following AOAC [16] methods and they include:
90 moisture (method 925.10), protein (method 920.87), fat (method 922.06), ash (method 923.03) and total dietary
91 fiber (method 991.43). Carbohydrates were calculated by difference: $100 - (\% \text{ water} - \% \text{ protein} - \% \text{ total fat} - \% \text{ total ash} - \% \text{ total dietary fibre})$ [17]. Na and K were analysed by inductively coupled plasma atomic emission
92 spectroscopy (ICP-AES) using a Perkin-Elmer Optima 7300-DV spectrophotometer (Waltham MA, USA), following
93 microwave digestion of the samples with nitric acid and hydrogen peroxide. The extract obtained was then diluted
94 and absorbance was read at a wavelength of 589.59 nm for Na and 766.49 nm for K. Quantification of both
95 elements was performed by external calibration. GABA was determined by reverse-phase high performance liquid
96 chromatography, followed by UV detection after pre-column derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydrxy succinyl
97 carbamate (AccQTag) according to Cohen and Michaud [18]. For peptides determination, breads and sourdough
98 were ultrafiltrated through membranes of 3 kDa pore size (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Permeates
99 were analyzed by the DC protein assay (Biorad) using BSA as standard.

101 *Biological Activity Testing*

102 Antioxidant activity was analyzed by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL) method [19] in
103 methanolic extracts and the water soluble 3 kDa peptide fraction of breads prepared according to Caceres et al.
104 [20] and Garcia-Mora et al. [19], respectively. ACE-inhibitory activity of the 3 kDa peptide fraction of water-soluble
105 extracts of samples was measured following the fluorescence-based protocol of Sentandreu and Toldrá [21]. IC₅₀
106 was determined by dose–response curves using the non-linear regression sigmoidal curve fit function in GraphPad
107 Prism 4.00 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

108 *MALDI-TOF Analyses*

109 Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) analysis was performed in a Voyager-DE
110 PRO mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with a pulsed 337 nm nitrogen laser (1
111 ns pulse width and 3 Hz frequency) which was operated in the reflector mode for positive ions. The 3 kDa peptide

112 fraction of breads was mixed with the matrix at a ratio of 1:5 (v/v), and 1 μ L of this solution was spotted onto a flat
113 stainless-steel sample plate and dried in air. Mass spectra were obtained at m/z range 500-4000. External mass
114 calibration was applied using the monoisotopic [M + H]⁺ values of des-Arg¹ Bradykinin, Angiotensin I, Insuline,
115 Glu1-Fibrino-peptide B, adrenocorticotropic hormone fragments 1-17, 18-39, and 7-38. Parameters of the
116 instrument were as follows: time of flight analyser (1.3 m flight path) with an acceleration voltage of 20 kV, 76%
117 grid voltage, 0.001% ion guide wire voltage, and a delayed extraction time of 400 ns.

118 *Statistical Analysis*

119 Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by Statgraphics Centurion XVI software, version
120 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Md). Differences between samples were compared by using a
121 Duncan's multiple-range test at $P \leq 0.05$ probability levels.

122 **Results and Discussion**

123 *Proximate Composition, Protein and Peptide Profiles*

124 The proximate composition (moisture, protein, fat, ash and carbohydrates) did not significantly differ ($P > 0.05$)
125 between breads (Table 2), with the exception of dietary fiber that was significantly lower in CB. Potassium content
126 was 2-fold higher while sodium content was 1.5-fold lower in low sodium breads (LSB and SDB compared to
127 control ($P \leq 0.05$). These results are consistent with the replacement of sodium chloride by potassium citrate in the
128 formulation of these breads.

129 GABA concentration in low-sodium wheat bread was similar ($P > 0.05$) to control (Table 2), therefore, replacement
130 of sodium by potassium salt did not influence GABA content in experimental breads. GABA is produced during
131 dough mixing and yeast's fermentation by conversion of glutamic acid by glutamate decarboxylase of wheat and
132 yeast [22]. In our study, GABA concentration in SDB increased 7 times by addition of sourdough in bread
133 formulation ($P \leq 0.05$). GABA content in SD reached a concentration 15-fold higher than those previously reported
134 for sourdoughs of wheat, pseudocereals and legume flours started with a pool of selected LAB [23,10]. Protease
135 addition during sourdough fermentation increases the concentration of free amino acids [24] such as glutamine
136 and glutamate improving the production yield of GABA during sourdough fermentation [25]. Additional protein
137 degradation and glutamine and glutamate metabolism by lactobacilli glutaminases and glutamate decarboxilase
138 give rise to GABA accumulation in sourdough [25]. GABA concentration in low-sodium SDB was much lower than
139 the theoretical concentration expected from the addition of SD at a level of 21% (1230.8 mg/100g d.m.). GABA

140 losses have been reported during bread making due to its consumption by yeast during proofing and thermal
141 degradation by Maillard browning reactions that take place during baking [22]. An additional degradation of GABA
142 might have occurred during thermal inactivation of protease (70 °C for 2 min) after sourdough fermentation.
143 Human intervention studies have shown that a daily intake of 10-20 mg of GABA is able to prevent pre-
144 hypertension [9,26]. The results of the present study suggest that a daily consumption of 100 g of bread (fresh
145 weight) would provide enough GABA (22.4 mg) to display the health benefits observed in the previous studies.

146 Bioactive peptides with ACE inhibitory and antioxidant activity have a molecular weight below 3 kDa, therefore, the
147 quantification of peptides < 3 kDa was carried out in this study. Results in Table 2 show that LSB and CB had a
148 similar concentration of peptides < 3 kDa ($P>0.05$), unlike SDB with a concentration 3 times higher than those
149 found in LSB and CB ($P<0.05$). Sourdough fermentation is known to cause an increase in the concentration of
150 peptides compared with bread dough [27] due to proteolysis by LAB proteases and peptidases. The use of
151 commercial proteases during wheat flour sourdough fermentation may result in a more extensive proteolysis and,
152 subsequently, in an increase of peptides yield. SDS-PAGE shows that protease addition and SD fermentation by
153 *L. brevis* CECT 8183 gave rise to intense protein bands with a range of molecular masses between 30-40 and 58-
154 70 kDa and small protein fragments at molecular masses below 20 kDa (Fig. 1; lane 4). In spite of no differences
155 were observed by SDS-PAGE in the protein profile of SDB compared to LSB and CB (Fig. 1, lanes 1-3), a different
156 peptide profile was found by MALDI-TOF between 3 kDa permeates from SDB and its respective control (LSB)
157 (Table 3). Bolded peptide masses at m/z 519, 523, 537, 544, 549, 565, 609, 610, 613, 713, and 723 were only
158 found in SDB, therefore, they could be released during sourdough fermentation. Comparing our results with
159 reported SDS-PAGE profiles [28] and peptide content [10,28] of wholemeal wheat sourdoughs fermented by
160 different LAB strains (13.0-22.5 mg/g of sourdough d.m., Table 2) we found that addition of commercial protease
161 during sourdough fermentation resulted in a more extensive proteolysis and a markedly enrichment of peptides < 3
162 kDa (57.7 mg/g of sourdough d.m.). Peptide concentrations in SDB (11.3 mg/g d.m., Table 2) were slightly lower
163 than the theoretical concentration expected from the addition of SD at a level of 21% (12.7 mg/g d.m.). This lower
164 peptide concentration could be due to their degradation as consequence of Maillard reactions that take place
165 during baking [29] and at the end of sourdough fermentation. Zhao et al. [29] reported a decrease in peptide
166 content due to LAB enzymatic activity at the proofing and kneading stages. In our study this effect was unlikely to
167 occur since a thermal treatment at 70°C for 2 min was applied for enzymatic inactivation.

168 *ACE Inhibitory and Antioxidant Activities*

169 Table 4 shows ACE inhibitory and antioxidant activities of 3 kDa permeates of water-soluble extracts obtained
170 from sourdough and experimental breads. ACE inhibitory and antioxidant activity of the peptide fraction < 3 kDa
171 from SDB was 2 times and up to 3 times higher, respectively than those of LSB and CB ($P \leq 0.05$). These results
172 are due to bread supplementation with SD in which the release of amino acid sequences with antioxidant and ACE
173 inhibitory activities from grain storage proteins may occur by protease and peptidase activities [27,11,12]. Positive
174 correlation between peptide content and ACEI inhibitory or antioxidant activities of breads supports this
175 consideration (Table 4).

176 ACE inhibitory activity of the peptide fraction < 3 kDa from SD (0.09 mg peptide/mL) was between 2.1-26 times
177 higher than those reported previously (0.19-0.54 mg/mL) for peptide fractions from wheat sourdoughs started by a
178 pool of selected LAB [10]. Type of wheat grain variety, composition of starter culture, addition of protease, dough
179 yield and processing conditions (fermentation time and temperature) could explain these differences. The
180 comparison of IC_{50} values of 3 kDa permeates from SD (94.8 $\mu\text{g/mL}$) and SDB (127.2 $\mu\text{g/mL}$) indicated that ACE
181 inhibitory activity remained stable after kneading, proofing and baking stages. Therefore, it can be assumed that
182 ACE inhibitory peptides released during sourdough fermentation were not further degraded as consequence of
183 yeast metabolism and thermal treatment in agreement with previous findings [29]. No previous studies have
184 addressed the impact of bread making on the antioxidant activity of peptides.

185 Clinical trials with hypertensive humans indicate that consumption of 3-6 mg of peptides derived from milk proteins
186 with ACE-inhibitory activity per day reduces systolic BP [13]. Although SDB was not evaluated *in vivo*, an initial
187 assessment of their bioactivity can be made based on the comparison of IC_{50} (127.23 $\mu\text{g/mL}$) with the theoretical
188 concentration of peptides reached in blood after consumption of one serving of fresh SDB. One serving of SDB
189 (100 g fresh weight) contains 723 mg of peptides <3 kDa, therefore, it can be assumed that this amount may reach
190 the absorption site in the intestine and further the blood stream at a concentration 2 times higher than the IC_{50}
191 value of 3 kDa peptide fraction (241 $\mu\text{g/mL}$) in a reference person containing approximately 3 L of plasma.
192 Although gastrointestinal digestion, absorption, transport and metabolism are likely to impact ACE inhibitory
193 activity of bioactive peptides, results from the present study are promising and deserve further research to
194 evaluate the antihypertensive effect of SDB *in vivo*.

195 Antioxidant activity was also analyzed in acidified methanolic extracts from sourdough and breads (Table 4). It is
196 worth noting that ORAC values of methanolic extracts were higher than those found for the ≤ 3 kDa peptide
197 fraction. Higher antioxidant capacity of methanolic extracts could be attributed to a better solubility and extraction
198 of compounds with antioxidant activity such as phenolics [30]. Similarly to results found in the peptide fraction < 3
199 kDa, bread supplemented with 21% wheat sourdough gave rise to ORAC values 1.5 and 1.9-fold higher than the
200 observed in LSB and CB, respectively (Table 4). Cereal fermentation by LAB result in an increase and
201 bioconversion of free phenolic compounds [31], effect that could be related with the increased ORAC values
202 observed in SDB. Cereal and LAB enzymes are key contributors on the conversion of phenolic acids during
203 fermentation [32] which have been found directly related to an increased antioxidant activity in fermented products
204 [33]. Comparing SD to SDB, it is worth noting that the bread making process seems to have no impact on the
205 antioxidant activity. However, the synthesis of substances with antioxidant properties, including certain Maillard
206 reaction products that are accumulated in the bread crust, may mask the real decrease of antioxidants in bread as
207 well as any loss in total antioxidant activity [34].

208 **Conclusions**

209 This study shows that bread supplemented with wheat sourdough produced by *L. brevis* CECT 8183 and a
210 commercial protease markedly improved the total antioxidant activity of bread and its content in GABA and small
211 peptides (< 3 kDa) with ACE-inhibitory and antioxidant activity. Therefore, the combination of reduced sodium
212 content with enriched concentrations of bioactive compounds such as GABA, ACE inhibitory and antioxidant
213 peptides may provide interesting perspectives for development of innovative breads aimed at reducing blood
214 pressure.

215 **Acknowledgments** Supported by Europastry S.A., St. Cugat del Valles, Barcelona, Spain and Ministry of
216 Economy and Competitiveness (project number AGL2010-16310).

217 **REFERENCES**

- 218 1. World Health Organization (2009) Causes of death;
219 http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods. Pdf, 2008 (accessed April 12,
220 2012)
- 221 2. Webster JL, Dunford EK, Hawkes C, Neal BC (2011) Salt reduction initiatives around the world. Journal of
222 Hypertension 29 (6):1043-1050

- 223 3. Adebisi AP, Adebisi AO, Yamashita J, Ogawa T, Muramoto K (2009) Purification and characterization of
224 antioxidative peptides derived from rice bran protein hydrolysates. *European Food Research and Technology* 228
225 (4):553-563
- 226 4. Braschi A, Gill L, Naismith DJ (2009) Partial substitution of sodium with potassium in white bread: Feasibility
227 and bioavailability. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60 (6):507-521
- 228 5. Quilez J, Salas-Salvado J (2012) Salt in bread in Europe: Potential benefits of reduction. *Nutrition Reviews* 70
229 (11):666-678
- 230 6. Arendt EK, Ryan LAM, Dal Bello F (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology* 24
231 (2):165-174
- 232 7. Bryszewska MA, Ambroziak W, Langford NJ, Baxter MJ, Colyer A, Lewis DJ (2007) The effect of consumption
233 of selenium enriched rye/wheat sourdough bread on the body's selenium status. *Plant Foods for Human Nutrition*
234 62 (3):121-126
- 235 8. Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, Matsumoto K, Sansawa H, Yamori Y (2004) Effect of a γ -aminobutyric acid-
236 enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats.
237 *British Journal of Nutrition* 92 (3):411-417
- 238 9. Inoue K, Shirai T, Ochiai H, Kasao M, Hayakawa K, Kimura M, Sansawa H (2003) Blood-pressure-lowering
239 effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of*
240 *Clinical Nutrition* 57 (3):490-495
- 241 10. Rizzello CG, Cassone A, Di Cagno R, Gobbetti M (2008) Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-
242 inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria.
243 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (16):6936-6943
- 244 11. Hu Y, Stromeck A, Lojonen J, Lopes-Lutz D, Schieber A, Gänzle MG (2011) LC-MS/MS quantification of
245 bioactive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in rye malt sourdoughs. *Journal of Agricultural and*
246 *Food Chemistry* 59 (22):11983-11989
- 247 12. Coda R, Rizzello CG, Pinto D, Gobbetti M (2012) Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides
248 during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (4):1087-1096
- 249 13. Ricci I, Artacho R, Olalla M (2010) Milk protein peptides with angiotensin I-Converting enzyme inhibitory
250 (ACEI) activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50 (5):390-402

- 251 14. Diana M, Tres A, Quílez J, Llombart M, Rafecas M (2014) Spanish cheese screening and selection of lactic
252 acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. *LWT - Food Science and Technology* 56 (2):351-355
- 253 15. Dupont FM, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Altenbach SB (2011) Deciphering the complexities of the
254 wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass
255 spectrometry. *Proteome Science* 9
- 256 16. AOAC International (2005) *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th Edition, Gaithersburg, MD,
257 USA.
- 258 17. Food energy – methods of analysis and conversion factors. (2002) *Food and Nutrition Paper*.
- 259 18. Cohen SA, Michaud DP (1993) Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-
260 hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-
261 performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 211 (2):279-287
- 262 19. Garcia-Mora P, Peñas E, Frias J, Martínez-Villaluenga C (2014) Savinase, the most suitable enzyme for
263 releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties.
264 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (18):4166-4174
- 265 20. Cáceres PJ, Martínez-Villaluenga C, Amigo L, Frias J (2014) Maximising the phytochemical content and
266 antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chemistry*
267 152:407-414
- 268 21. Sentandreu MÁ, Toldrá F (2006) A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme
269 activity. *Nature Protocols* 1 (5):2423-2427
- 270 22. Lamberts L, Joye IJ, Beliën T, Delcour JA (2012) Dynamics of γ -aminobutyric acid in wheat flour bread
271 making. *Food Chemistry* 130 (4):896-901
- 272 23. Coda R, Rizzello CG, Gobbetti M (2010) Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous
273 flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food*
274 *Microbiology* 137 (2-3):236-245
- 275 24. Diana M, Rafecas M, Quílez J (2014) Free amino acids, acrylamide and biogenic amines in gamma-
276 aminobutyric acid enriched sourdough and commercial breads. *Journal of Cereal Science*:in press
- 277 25. Stromeck A, Hu Y, Chen L, Gänzle MG (2011) Proteolysis and bioconversion of cereal proteins to glutamate
278 and γ -aminobutyrate (GABA) in rye malt sourdoughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (4):1392-1399

- 279 26. Pouliot-Mathieu K, Gardner-Fortier C, Lemieux S, St-Gelais D, Champagne CP, Vuilleumard JC (2013) Effect of
280 cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria on blood pressure in men.
281 *PharmaNutrition* 1 (4):141-148
- 282 27. Nakamura T, Yoshida A, Komatsuzaki N, Kawasumi T, Shima J (2007) Isolation and characterization of a low
283 molecular weight peptide contained in sourdough. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (12):4871-4876
- 284 28. Rizzello CG, Nionelli L, Coda R, Gobbetti M (2012) Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic
285 acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutrition and Cancer* 64 (1):111-120
- 286 29. Zhao CJ, Hu Y, Schieber A, Gänzle M (2013) Fate of ACE-inhibitory peptides during the bread-making
287 process: Quantification of peptides in sourdough, bread crumb, steamed bread and soda crackers. *Journal of*
288 *Cereal Science* 57 (3):514-519. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2013.02.009>
- 289 30. Bae H, Jayaprakasha GK, Crosby K, Jifon J, Patil B (2012) Influence of Extraction Solvents on Antioxidant
290 Activity and the Content of Bioactive Compounds in Non-pungent Peppers. *Plant Foods for Human Nutrition* 67
291 (2):120-128. doi:10.1007/s11130-012-0290-4
- 292 31. Kim D, Han GD (2011) Ameliorating Effects of Fermented Rice Bran Extract on Oxidative Stress Induced by
293 High Glucose and Hydrogen Peroxide in 3T3-L1 Adipocytes. *Plant Foods for Human Nutrition* 66 (3):285-290
- 294 32. Gänzle MG (2014) Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*
295 37:2-10
- 296 33. Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, de las Rivas B, de Felipe FL, Gómez-Cordovés C, Mancheño JM, Muñoz
297 R (2009) Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 132 (2–3):79-90.
298 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>
- 299 34. Zhang M, Chen H, Li J, Pei Y, Liang Y (2010) Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected
300 by different thermal processing methods. *LWT - Food Science and Technology* 43 (1):181-185.
301 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.020>

Table 1 Formulas used for manufacture of conventional wheat bread (CB), low-sodium wheat bread (LSB), low-sodium sourdough bread (SDB).

Ingredients (%)	CB	LSB	SDB
Wheat flour	62.62	62.62	60.09
Water	35.07	35.07	16.82
Sodium chloride	1.13	0.81	0.78
Baker's yeast	0.94	0.94	0.90
Improver	0.25	0.25	0.24
Sourdough	-	-	21.03
Potassium citrate	-	0.31	0.13

Table 2 Proximate composition and GABA content of conventional wheat bread (CB), low-sodium wheat bread (LSB), low-sodium wheat sourdough bread (SDB) and sourdough (SD).

	CB	LSB	SDB	SD
Humidity (%)	35.93 ± 0.31 ^a	35.53 ± 0.35 ^a	36.00 ± 0.44 ^a	84.93 ± 0.15 ^b
Protein (% d.m.)	13.89 ± 0.14 ^b	13.78 ± 0.14 ^b	14.06 ± 0.16 ^b	18.10 ± 0.45 ^a
Fat (% d.m.)	2.00 ± 0.14 ^b	1.93 ± 0.12 ^b	1.95 ± 0.15 ^b	5.76 ± 0.87 ^a
Ash (% d.m.)	2.66 ± 0.06 ^b	2.48 ± 0.12 ^b	2.49 ± 0.13 ^b	6.62 ± 0.81 ^a
Total Fiber (% d.m.)	3.15 ± 0.19 ^b	4.03 ± 0.25 ^c	3.97 ± 0.23 ^c	< 3.31 ^a
Carbohydrates (% d.m.)	78.30 ± 0.47 ^b	77.78 ± 0.67 ^b	77.53 ± 0.44 ^b	69.29 ± 1.71 ^a
Potassium (mg/100 g d.m.)	205.50 ± 14.50 ^a	399.15 ± 18.18 ^b	420.31 ± 23.02 ^b	3944.81 ± 53.12 ^c
Sodium (mg/100 g d.m.)	817.86 ± 12.39 ^c	576.50 ± 13.19 ^b	557.81 ± 18.94 ^b	< 66.22 ^a
GABA (mg/100 g d.m.)	4.99 ± 0.07 ^a	5.18 ± 0.10 ^a	35.05 ± 1.30 ^b	5860.93 ± 176.59 ^c
Peptides <3kDa (mg/g d.m.)	3.64±0.12 ^a	3.62±0.26 ^a	11.30±0.85 ^b	57.70±3.62 ^c

Data indicate mean value ± standard deviation of three independent experiments. Means with different letters within a row are significantly different ($P \leq 0.05$, Duncan test).

Table 3 Peptide masses¹ profile by MALDI-TOF found in 3 kDa permeates from low-sodium wheat bread (LSB) and low-sodium wheat sourdough bread (SDB)

Ion mass (m/z)	Relative Intensity (%)	
	LSB	SDB
509	22.82	52.25
519	nd ²	23.63
523	nd	23.93
527	52.37	61.17
528	42.37	44.13
529	31.5	34.27
530	41.61	34.93
537	nd	42.56
542	26.21	32.32
544	nd	31.6
548	25.4	34.89
549	nd	29.23
550	32.36	31.17
553	19.39	37.61
555	29.73	46.09
556	33.5	37.54
565	nd	34.46
568	60.38	50.03
569	30.91	33.12
609	nd	28.15
610	nd	30.5
613	nd	23.96
650	48.46	41.96
656	100	64.01
657	39.99	25.54
659	88.85	nd
660	45.87	nd
666	45.25	35.77
672	95.68	100
673	32.9	45.3
687	30.23	43.85
713	nd	24.63
723	nd	22.51
861	44.62	32.48
877	51.37	38.57

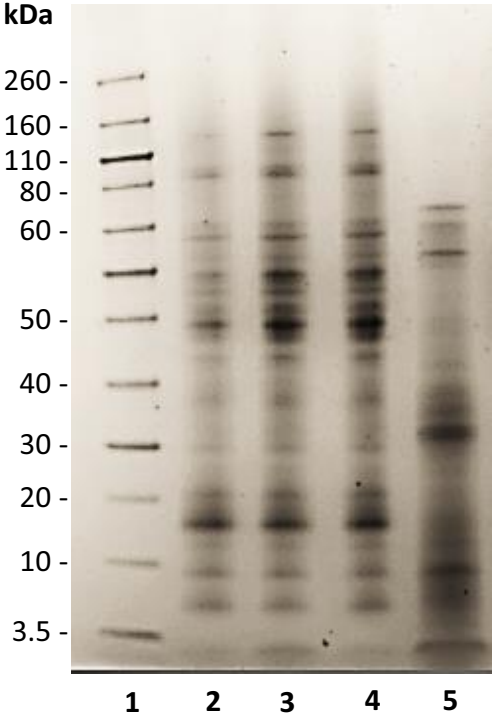
¹Peptides masses with intensities $\geq 20\%$; ² nd: not detected. Bolded ion masses were only found in SDB

Table 4 Peptide concentration, ACE-inhibitory (calculated as % inhibition and IC₅₀ value) and antioxidant activities (measured by ORAC) of 3 kDa permeate from conventional wheat bread (CB), low-sodium wheat bread (LSB) and low-sodium wheat sourdough bread (SDB) and sourdough (SD).

Sample	Peptide fraction < 3 kDa			Methanolic extract
	ACE inhibition (%)	IC ₅₀ (µg peptide/mL)	ORAC (µM TE)	ORAC (µmol TE/g d.m.)
CB	10.29±0.81 ^a	258.27±30.46 ^b	474.98±29.23 ^a	2090.37 ± 238.06 ^a
LSB	10.29±0.81 ^a	212.47±17.51 ^b	555.14±58.53 ^a	2646.27 ± 350.77 ^a
SDB	68.18±0.79 ^b	127.23±15.77 ^a	1461.61±77.19 ^b	4018.96 ± 450.88 ^b
SD	95.13±0.15 ^c	94.80±10.80 ^a	8317.81±731.46 ^c	18217.13 ± 890.94 ^c
Pearson r [#]	0.8327 [*]		0.9984 [*]	
P-value	0.0003		0.0000	

Data indicate mean value ± standard deviation of three independent experiments. Means with different letters within rows are significantly different ($P \leq 0.05$, Duncan test).[#]Pearson r correlation coefficient between peptide concentration and ACE inhibition or ORAC in the 3 kDa permeate. * Significant correlation, $P < 0.05$.

Fig. 1 SDS-PAGE profile of protein extracts prepared from conventional bread (CB, lane 2), low-sodium wheat bread (LSB, lane 3), low sodium wheat sourdough bread (SDB, lane 4) and sourdough (SD, lane 5). Molecular weight standards are shown in lane 1.



5. Discusión general

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. Uno de los factores más importantes causantes de estas enfermedades es la hipertensión cuyo aumento tiene una relación directa con el consumo elevado de sal (Hu & McGregor, 2002). Es por ello, que la OMS recomienda cambios dietéticos y de estilo de vida entre los que se encuentra la reducción de la ingesta de sal diaria, el aumento del consumo de frutas y verduras, no fumar y la práctica de ejercicio físico, entre otros. El pan es considerado como uno de los alimentos que más sal proporciona en la dieta (20-25%), por tanto ha sido y sigue siendo uno de los objetivos clave para las estrategias de reducción de sal. El consumo de pan en Europa ha tendido a decrecer en los últimos años, con una media de consumo actual de 170 g/día. Sin embargo, su consumo aporta el 19% del sodio total ingerido en la dieta.

En base a esto, este proyecto de tesis es una continuación de los acuerdos NAOS de reducción de sal en el pan. Una de las actuaciones que contempla la estrategia NAOS se basa en la reducción progresiva del porcentaje de sal utilizado en la elaboración del pan logrando disminuir el porcentaje de sal del 2,2% hasta el 1,8% sobre la base de harina (equivalente a 18 g de cloruro de sodio/Kg de harina). La reducción paulatina en el contenido de sal ha permitido una adaptación gradual del gusto de los consumidores a un pan menos salado, lo que hace del pan español uno de los menos salados de Europa.

Paralelamente a la reducción de sodio, en este trabajo se evaluó la habilidad proteolítica por parte de las BAL aisladas de quesos artesanales españoles. Por tanto, en este proyecto se engloban los principales factores que podrían ayudar a controlar o reducir la hipertensión: la reducción de sal y su posible sustitución por otra sal potásica y la inclusión en el pan de moléculas bioactivas a través de la acción metabólica microbiana. A estos posibles beneficios saludables se suma el bajo coste añadido al precio final del producto lo cual aporta una rentabilidad muy atractiva a nivel industrial. Para llevar a cabo este objetivo, se estudió la obtención de bacterias ácido lácticas altamente productoras de GABA que pudieran participar en la fermentación de la masa madre para conseguir un pan rico en GABA y péptidos inhibidores de la ECA, así como la reducción y parcial sustitución de la sal común.

Diferentes marcas de quesos españoles artesanos se escogieron para el aislamiento de bacterias ácido lácticas entre los que se encontraban los frescos, semi-curados y curados de distintos orígenes de leche animal (I). Diferentes estudios han reportado el uso de otras matrices alimentarias para la adquisición de cepas productoras de GABA, en concreto alimentos tradicionales fermentados tales como el kimchi (Lu et al., 2008; Park & Oh, 2007a; Seok et al., 2008), la masa madre (Rizzello et al., 2008) y el *poacai* (Li et al., 2008). No obstante, en este proyecto el interés en los quesos radicaba en la mayor variabilidad microbiológica salvaje, que diverge notablemente de las cepas comerciales usadas como estarteres (Klijn et al., 1995) y en la obtención de un estudio posterior que permitiera conocer el perfil aminoacídico de los quesos españoles. En otro estudio publicado por Siragusa et al. (2007) se usaron 22 variedades de quesos italianos para el aislamiento de cepas ácido lácticas y su *screening* para la capacidad sintetizadora de GABA.

En la primera fase experimental, se procedió a aislar bacterias ácido lácticas de más de 64 quesos y a evaluar la capacidad productora de GABA para cada una de las cepas aisladas mediante un ensayo

cualitativo propuesto por Yang et al., 2006 (Método del Indicador de pH). Las cepas que resultaban positivas eran conservadas para su posterior evaluación cuantitativa de la concentración del amino ácido. En una segunda fase experimental, se cuantificó el GABA que producían cada una de las cepas aisladas en un medio natural de masa madre (80% agua y 20% de harina integral de trigo) (Figura 9). Estos resultados se aprovecharon para inscribir una patente (V), en la que se pone de manifiesto la alta capacidad productiva de GABA en masas madre y el uso de estas cepas para la fabricación de alimentos funcionales, complementos nutricionales y/o farmacéuticos.

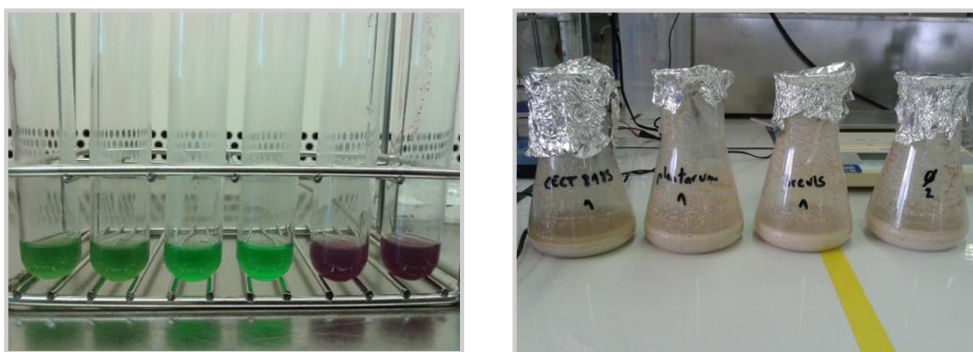


Figura 9. *Resultados del screening*. En la imagen de la izquierda se muestran los tubos de ensayo para la evaluación cualitativa: tras la adición de unas gotas de un complejo indicador, la cepa mostraba actividad GAD si el color cambiaba de magenta a verde. En la imagen de la derecha se muestra los matraces Erlenmeyer con masa madre donde se ensayaban las cepas. La concentración de GABA se cuantificó mediante CLAE.

En el ensayo cualitativo, la eficiencia de la cepa se medía en función del pH alcanzado en la solución de glutamato dónde las cepas eran incubadas. Primeramente el medio era ajustado a un pH de 4,7 con el fin de activar la enzima GAD. Además, valores de pH entre 4,2 y 4,7 son los óptimos para las cepas *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Yang et al., 2006). Valores más altos de pH indicaban mayor producción del amino ácido, algo que se observaba también a nivel visual. Cambios de color de magenta a verde intenso (fosforito) indicaba mayor subida de pH extracelular y, por ende, mayor producción de GABA. Es importante recordar que la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) opera combinando un aminoácido interno (lisina, arginina o glutamato) con un protón e intercambiando el producto resultante (cadaverina, agmatina o gamma-aminobutirato) por otro sustrato de aminoácido. Así pues, un aminoácido extracelular se convierte en un producto extracelular, pero el consumo de protones intracelulares resulta en un incremento del pH intracelular (Cotter & Hill, 2003). Por tanto, el sistema glutamato descarboxilasa es un mecanismo de resistencia a pH bajos (Yuko et al., 2011).

Existen numerosos métodos que han sido validados para la detección de GABA mediante la producción de BAL. Entre los más usados se encuentran el analizador de aminoácidos, la cromatografía (líquida y capilar) y el análisis por inyección por flujo (FIA). No obstante, estos métodos requieren una preparación tediosa de la muestra y consumo de tiempo. En el trabajo de *screening* se barajaron otros como por ejemplo la cromatografía plana o el del enzima basado en la placa de microtitulación

(EBMPA), que son muy útiles para un análisis amplio de muestras pero requieren reactivos caros y muchos pasos experimentales. En este estudio, se escogió la técnica del indicador de pH (PIM) por la sencillez, la reproducibilidad del método y el mínimo gasto económico.

En total se obtuvieron 65 cepas positivas de 23 quesos diferentes de un total de 58 quesos analizados. Entre ellas, se obtuvieron 10 altamente productoras de GABA. El tipo de queso, en este caso, juega un papel crucial en la calidad metabólica de las cepas, particularmente por el tipo de materia prima con la que está elaborada el queso. En este estudio, cepas aisladas de queso de oveja, cabra o mezcla de leches resultaron tener más capacidad que aquellas de vaca. En el estudio reportado por Siragusa et al. (2007) los quesos curados de oveja contenían los niveles mayores de GABA y las cepas más altamente productoras. Cabe destacar que el pequeño porcentaje de cepas positivas (productoras de GABA) encontradas (11,2%) fue similar al encontrado por Siragusa et al (2007) (14%), el cual aisló 61 cepas productoras de GABA de un total de 22 quesos. Aunque los quesos difirieron en su origen, el tipo de curación fue el mismo (curado). Para la distinción de las cepas obtenidas, se usó el sistema API 50 CHB, que de acuerdo con Martínez (2008) es uno de los métodos más útiles y usados para la identificación a nivel de especies.

Tras el aislamiento de cepas en los quesos, éstos fueron guardados en congelador hasta su posterior análisis. Un total de 34 quesos diferentes fueron seleccionados para determinar y conocer el perfil de aminoácidos libres con especial interés en la concentración de GABA (II). El objetivo de este estudio fue doble: 1) encontrar relación entre las cepas que más potencial mostraron en cuanto a la producción de GABA y la concentración de GABA presente en los quesos dónde fueron aisladas, 2) dar a conocer la composición de 18 aminoácidos en los quesos y dejar constancia de la cantidad de GABA y ornitina como compuestos bioactivos de interés. Los resultados mostraron que la cepa con mayor potencial (*Lactobacillus brevis* CECT 8183) provenía del queso con mayor contenido de este aminoácido. Se trató de un queso curado de oveja con una concentración de GABA de 0,98 g/Kg. No obstante, no se encontró más relación para el resto de cepas que resultaron positivas en el *screening*. En Italia, Siragusa et al. (2007) también mostró altas concentraciones de GABA en varios quesos maduros siendo dos de leche de oveja los que contenían las mayores concentraciones: 289 y 391 mg/kg. Nomura et al. (1998) también publicó las concentraciones de aminoácidos libres en 7 quesos comerciales diferentes y reportaron: 177, 48, 7,1 y 4,2 mg/kg de GABA para los quesos Gouda, Cheddar, Eddam y Azul, respectivamente. En todos estos casos, los niveles de GABA fueron inferiores a los publicados en nuestro estudio. La ornitina fue, en este caso, también objeto de interés ya que se ha demostrado que tiene efectos ansiolíticos (Kurata et al., 2011) y detoxificantes (Sugino et al., 2008) y sus beneficios funcionales en el marco alimentario están poco explotados. Las concentraciones de ornitina en las muestras variaron entre 0,07 g/kg y 1,59 g/kg, cuyo rango fue más alto que el encontrado por Pinho et al. (2001) (de trazas a 4 mg/kg). La ornitina se forma a partir de la actividad descaboxilasa del metabolismo de las BAL a través de los precursores arginina y citrulina en los primeros estados de la curación. Esta explicación podría justificar el por qué la media de concentración más alta encontrada fue en quesos semicurados, ya que a partir de este punto la concentración de aminoácido disminuye probablemente debido a la degradación de la actividad arginasa.

Posteriormente, la obtención de una masa madre rica en GABA gracias a la acción de la cepa patentada *Lactobacillus brevis* CECT 8183 fue fruto del diseño experimental llevado a cabo con diferentes ingredientes y distintas cepas productoras de GABA aisladas de los quesos y patentadas (Tabla 13) (III). Tras la realización de estas 16 pruebas de 48h de duración cada una, se ensayaron 6 pruebas más con dos cepas seleccionadas (*L. brevis* CECT 8183 y *Lactococcus lactis* spp) y nuevos ingredientes que pudieran optimizar la producción de GABA en la masa. Estas pruebas se esquematizan en la Tabla 14. Las pruebas 1-3 y 6 de la Tabla 13 incluyeron extracto de levadura y extracto de proteína de soja en la formulación de la masa madre experimental. El uso de estos ingredientes permitía, por un lado, una fuente adicional de glutamato (precursor del GABA) y, por el otro, un aumento de proteína de alto valor biológico que podría aumentar la liberación de amino ácidos libres, y por tanto, de GABA. Además, estos ingredientes están permitidos en la legislación de ingredientes del pan, con lo que a nivel normativo, el pan resultante estaría validado. No obstante, los resultados mostraron que, pese los efectos positivos que podrían aportar estos ingredientes, las concentraciones de GABA se mostraron similares o inferiores a las de las otras pruebas. La Tabla 15 muestra las concentraciones de GABA obtenidas en las 6 pruebas de optimización y, además, se reportan los mililitros de carbonato de potasio (KHCO) gastados en el control del pH durante el proceso fermentativo y su equivalencia en gramos de potasio (K⁺).

El conjunto de ingredientes que resultaron más eficaces fueron la harina integral de trigo, la harina de soja tostada, la proteasa y el agua. Durante 48h de fermentación, el pH era controlado (4,5) para la optimización de la producción de GABA por parte de la cepa implicada. La adición gradual de carbonato potásico permitía controlar la acidez de la masa y los gramos de potasio gastados en el *batch* servirían de sustitutos del sodio en la fórmula final del pan. Esta reducción de sal en el pan afecta a una característica básica que es el sabor. La disminución de sal, por tanto, conlleva una disminución proporcional de la intensidad del sabor, de tal manera que se ha verificado que la frontera de concentración mínima de sal para lograr un pan significativamente mejor desde el punto de vista organoléptico es de 1,43% (Conner et al., 1988). Asimismo, panes con contenidos de sal inferiores al 1% tienen ya un efecto claramente negativo sobre el sabor del pan (Salovaara et al., 1982).

Tabla 13. *Diseño experimental*

Prueba	Cepa	Harina de trigo	Harina de soja	Proteasa
1	<i>L. brevis</i> CECT 8182	✓		
2	<i>L. brevis</i> CECT 8182	✓	✓	
3	<i>L. brevis</i> CECT 8182	✓		✓
4	<i>L. brevis</i> CECT 8182	✓	✓	✓
5	<i>L. Brevis</i> CECT 8183	✓		
6	<i>L. Brevis</i> CECT 8183	✓	✓	
7	<i>L. Brevis</i> CECT 8183	✓		✓
8	<i>L. Brevis</i> CECT 8183	✓	✓	✓
9	<i>Lactococcus lactis</i> spp.	✓		
10	<i>Lactococcus lactis</i> spp.	✓	✓	
11	<i>Lactococcus lactis</i> spp.	✓		✓
12	<i>Lactococcus lactis</i> spp.	✓	✓	✓
13	S.c.	✓		
14	S.c.	✓	✓	
15	S.c.	✓		✓
16	S.c.	✓	✓	✓

L., *Lactobacillus*; S.c., Sin cepa.

Tabla 14. Diseño de optimización de la producción de GABA en masa madre.

Prueba	Cepa	Harina de trigo	Harina de soja	Proteasa	Extracto de levadura	Extracto de proteína de soja
1	<i>L. Brevis</i> CECT 8183	✓		✓	✓	✓
2	<i>Lactococcus lactis</i> spp.	✓	✓	✓	✓	✓
3	S.c.	✓	✓	✓	✓	✓
4	<i>L. Brevis</i> CECT 8183	✓	✓	✓		
5	<i>Lactococcus lactis</i> spp.	✓	✓	✓		
6	<i>L. brevis</i> CECT 8183 + <i>Lactococcus lactis</i> spp.	✓	✓	✓	✓	✓

S.c., sin cepa

Tabla 15. Concentraciones de GABA obtenidas en la optimización del proceso.

Prueba	KHCO (ml)	K ⁺ (g)	GABA (mg/L)
1	50	4,88	865,82
2	80	7,81	1.076,76
3	81	7,91	379,78
4	50	4,88	1.056,93
5	100	9,77	652,45
6	40	3,90	1.002,42

El contenido de sal del 1,4% en producto final, se corresponde aproximadamente con el 1,8% de sal sobre harina marcado por la estrategia NAOS, por lo que su disminución cuantitativa conduciría invariablemente a panes de inferior calidad. Como uno de los principios del proyecto ha sido la substitución parcial del cloruro de sodio por una sal potásica (citrato potásico), cabe señalar que en contraste con el sodio, el potasio tiene efectos beneficiosos en la presión arterial (Karppanen, 1991). En estudios epidemiológicos, las dietas altas en potasio están asociadas a una disminución del riesgo cardiovascular e infarto. Diversos mecanismos como el incremento de la natriuresis, reducción de la actividad nerviosa simpática, una disminución de la respuesta presora a la noradrenalina y a la angiotensina II, parecen estar involucrados en la reducción de la presión arterial por efecto del potasio. Además, desde el punto de vista reológico, aporta una fuerza iónica similar y sus efectos sobre la masa son parecidos.

Según muestra la Tabla 15, uno de los valores más altos de GABA se obtuvo en la prueba 4, que sólo incluía la cepa *L. brevis* CECT 8183 y los ingredientes básicos como la harina de trigo integral, harina de soja y la proteasa. Pese que el valor fue ligeramente inferior al obtenido en la prueba 2, se decidió trabajar en la producción de masa madre en base a la prueba 4 debido al menor uso de ingredientes y a que la inclusión de la cepa *L. brevis* CECT 8183 aseguraba una alta eficiencia de producción ya que en el ensayo cualitativo esta cepa resultó ser la más eficaz.

Una vez obtenidos 50 L aproximadamente de masa madre optimizada, éstos fueron llevados a una temperatura de 70°C durante 2-3 minutos con el fin de inactivar la proteasa. La elaboración de un pan con proteasa como ingrediente resulta prácticamente imposible, ya que esta enzima rompe la estructura del gluten y provoca la deformación del pan. Por tanto, se desarrolló un pan organoléptico y reológicamente óptimo que contenía un 21% de masa madre rica en GABA (98,2 mg/100 ml) con citrato potásico (0,13%) como reemplazante de la sal común (cloruro de sodio). Este valor de GABA fue similar al encontrado por Coda et al. (2010) (103 mg/100 ml) en un estudio en el que se usó la cepa *Lactococcus lactis subsp lactis* PUI para enriquecer una masa madre de garbanzo rica en GABA. Nuestro pan experimental se comparó con 11 panes comerciales y 12 de masa madre natural de supermercados y panaderías artesanales, respectivamente, en cuanto al contenido de aminoácidos (con especial interés de nuevo en el GABA) al de aminas biógenas y el nivel de acrilamida. En general se observó un incremento en los niveles de aminoácidos libres en las fermentaciones de masa madre. Tal y como los resultados mostraron, el mayor contenido de aminoácidos se encontró en el pan experimental (265 mg/100g) seguido por los panes con adición de masa madre (media de 61,0 mg/100 g) y el menor en los panes comerciales (media 41,94 mg/100 g). Esto puede ser explicado por el consumo de aminoácidos libres por parte de las levaduras, predominantes en los panes sin masa madre, que los consumen durante su crecimiento. Por otro lado, el análisis de acrilamida determinó el nivel de toxicidad de los panes, ya que este compuesto está considerado como carcinógeno para los humanos (IARC, 1994). Se observaron concentraciones de acrilamida estadísticamente más altas ($p < 0,05$) en los panes de masa madre debido probablemente al mayor tiempo de horneado a los que estos panes están expuestos en comparación con los comerciales/industriales. Numerosos autores han declarado que el tiempo de cocción incrementa significativamente la acrilamida (Becalski et al., 2003; Konings et al.,

2003). El pan experimental presentó menores niveles de acrilamida (33 µg/kg) que los máximos encontrados en algunos panes adquiridos en panaderías artesanas (44, 124 y 146 µg/kg) los cuales fueron aun así bajos comparados con los indicativos para los panes tostados (450 µg/kg) (Comisión Europea, 2013).

La importancia del análisis de las aminas biógenas (cadaverina, histamina, tiramina, putrescina, 2-feniletilamina y triptamina) también radica en su nivel de toxicidad ya que este conjunto de aminas, consideradas como las más significativas, pueden provocar un cuadro tóxico tras su ingesta y numerosos efectos negativos. La presencia de tiramina se asocia con una elevación en la presión arterial y cefaleas. No obstante, la concentración encontrada en el pan experimental (41,8 ppm) fue suficientemente pequeña como para producir un efecto contrario al del GABA presente ya que, según publicó la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011), se necesitan entre 600 y 2.000 mg de tiramina administrados en una comida para causar un aumento mínimo de PAS.

Por último, se ha demostrado que las proteínas alimentarias con actividad ECA tienen una secuencia de 2 a 20 aminoácidos y un tamaño igual o inferior a 3.000 Da (Guang & Phillips, 2009). En cuanto a la actividad inhibidora de la ECA (VI), los resultados mostraron que el permeado < 3.000 Da procedente del extracto soluble de la masa madre fermentada mostró una potente inhibición (95%) que fue similar al control positivo (Captopril 0,1 µM) ($P \geq 0,05$). Estos resultados fueron comparables con los encontrados en la bibliografía para extractos solubles de masas fermentadas de trigo integral (12-95% de inhibición) obtenidos en las mismas condiciones que las utilizadas en este proyecto (Rizzello et al., 2008). Los permeados del pan elaborado con la masa madre mostraron una inhibición significativamente ($P \leq 0,05$) más alta (66-70%) que los permeados de pan control (9,8-14%) y bajo en sodio (9-11%). Estos resultados demuestran que el pan elaborado con la masa madre con alta actividad proteolítica (pan B) tiene una mayor actividad inhibidora de la ECA que los panes bajos en sodio (pan C) y el control (pan A). La Tabla 16 recoge los valores IC_{50} de las muestras, que se define como la concentración de péptidos expresada en µg/ml que inhibe el 50% de la actividad ECA. Se constató que la actividad IECA de la masa madre fermentada (95 µg péptido/ml) y el pan elaborado a partir de esta (127 µg péptido/ml) fue dos veces mayor ($P \leq 0,05$) a la del pan control (258 µg péptido/ml) y bajo en sodio (212 µg péptido/ml).

Tabla 16. Valores IC_{50} de las muestras analizadas.

MUESTRA	IC_{50} (µg/ml)
M	94,80±10,80
A	212,47±17,51
B	127,23±15,77
C	258,27±30,46

M, masa madre; A, pan control; B pan elaborado a partir de la masa madre; C, pan bajo en sodio.

El tratamiento de la masa madre con proteasa mejora la proteólisis y permite la liberación de péptidos pequeños favorables para la inhibición de la ECA. La IC_{50} del pan que contiene dicha masa (B) pone de manifiesto que la actividad inhibidora de la ECA se mantiene después del tratamiento de fermentación de la masa del pan y posterior cocción. Además, los péptidos inhibidores de la ECA presentes no se ven alterados por la actividad enzimática de las levaduras en la fermentación de la masa de pan.

En base a todos los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se abren numerosas vías de trabajo en el mundo de la investigación de las masas madre y la industria de la panadería. Un proyecto laborioso pero de incalculable interés es el ensayo clínico del pan experimental rico en GABA y péptidos inhibidores de la ECA obtenido en esta tesis. Por ello, el objetivo es el de evaluar mediante un ensayo clínico aleatorizado a doble ciego y cruzado realizado sobre sujetos con prehipertensión, o hipertensión leve o moderada, el efecto que tiene sobre la tensión arterial, la resistencia a la insulina, la inflamación y la función endotelial de la sustitución en la dieta del pan tradicional (1,4 g de cloruro sódico/100 g) por a) un pan reducido en cloruro sódico (1,0 g/100 g) y enriquecido en sales potásicas (0,4 g), y b) un pan reducido en cloruro sódico (1,0 g/100 g), enriquecido en sales potásicas (0,4 g) y rico en GABA (20 mg/100 g). Este ensayo clínico se inició en febrero de 2013 y continúa su curso en la actualidad.

6. Conclusions

Based on the results of this thesis, I have drawn the following conclusions:

1. The strains *Lactobacillus brevis* CECT 8183, 8181 and 8182, and *Lactococcus lactis* spp *lactis* CECT 8184, isolated from Spanish artisanal cheeses, have a high capacity to produce γ -aminobutyric acid both in non-optimised fermentation conditions (I,V) and in the optimised process using experimental sourdough (III).
2. Some Spanish artisanal cheeses contain high concentrations of GABA and of ornithine, which suggest important microbial activity (II).
3. The suitability of the bread obtained in the pilot plant justifies the inclusion of the strain *Lactobacillus brevis* CECT 8183 as a starter compound in the formulation of sourdough in order to produce bread enriched in GABA with no increase in production costs.
4. The experimental bread produced has a high GABA content and greater concentrations of free amino acids than other commercially produced bread. Despite the fact that the only biogenic amine found was tyramine, its concentration was low enough for it to have no negative effect on the GABA. There was less acrylamide in the bread produced in this work than in other bread produced commercially from dough containing naturally occurring lactobacilli and yeasts (III).
5. Both the hydrolysed and fermented experimental sourdough and the bread produced from it contain higher concentrations of peptides than the control bread. The peptide enrichment of the experimental sourdough and the bread produced from it corresponds with a significant increase in ACE inhibitor activity compared to the control bread. Therefore, the hydrolysis of proteins due to treatment of the experimental sourdough with commercial protease during the fermentation effectively liberates small peptides with ACE-inhibitor activity and anti-oxidant capacity; the bread continues to display this activity after baking (VI).

Referencias

- Abdou, A.M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H. & Yokogoshi, H. (2006). Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors*, 6 (3), 1-8.
- Abe, Y., Umemura, S., Sugimoto, K.I., Hirawa, N., Kato, Y., Yokoyama, N., Yokoyama, T., Junichi, I. & Masao I. (1995). Effect of green tea rich in γ -aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats. *American Journal of Hypertension*, 8 (1), 74-79.
- Abel, M. S. & McCandless, D.W. (1992). Elevated γ -Aminobutyric Acid Levels Attenuate the Metabolic Response to Bilateral Ischemia. *Journal of Neurochemistry*, 58 (2), 740-744.
- Adeghate, E. & Ponery, A.S. (2002). GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell*, 34, 1-6.
- Aoki, H., Uda, I., Tagami, K., Furuya, Y., Endo, Y. & Fujimoto, K. (2003). The production of a new tempeh like fermented soybean containing a high level of γ -aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 67 (5), 1018-1023.
- Aoshima, H., & Tenpaku, Y. (1997). Modulation of GABA receptors expressed in *Xenopus oocytes* by 13-L-hydroxylinoleic acid and food additives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61 (12), 2051-2057.
- Bhanwar, S., Bamnia, M., Ghosh, M. & Ganguli, A., (2013). Use of *Lactococcus lactis* to enrich sourdough bread with γ -aminobutyric acid. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 77-81.
- Bai, Q.Y., Fan, G.J., Gu, Z.X., Cao, X.H. & Gu, F.R. (2008). Effects of culture conditions on γ -aminobutyric acid accumulation during germination of foxtail millet (*Setaria italica* L.). *European Food Research Technology*, 228, 169-175.
- Banchuen, J., Thammarutwasik, P. Ooraikul, B., Wuttijumnong P. & Sirivongpaisal, P. (2010). Increasing the bio-active compounds contents by optimizing the germination conditions of Southern Thai Brown Rice. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 32 (3), 219-230.

Battaglioli, G., Liu, H. & Martin, D.L. (2003) Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *Journal of Neurochemistry*, 86 (4), 879-887.

Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D. & Seaman, S.W. (2003). Acrylamide in foods: occurrence, sources and modeling. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 51, 802-808.

Bjork, J.M., Moeller, F.G., Kramer, G.L., Kram, M., Suris, A., Rush, A.J. & Petty, F. (2001). Plasma GABA levels correlate with aggressiveness in relatives of patients with unipolar depressive disorder. *Psychiatry Research*, 101 (2), 131-6.

Cai, S., Gao, F., Zhang, X., Wang, O., Wu, W., Zhu, S., Zhang, D., Zhou, F. & Ji, B. (2012). Evaluation of γ -aminobutyric acid, phytate and antioxidant activity of tempeh like fermented oats (*Avena sativa* L.) prepared with different filamentous fungi. *Journal Food Science Technology*. DOI:10.1007/s13197-012-0748-2

Chen, Y., Baum, G. & Fromm, H. (1994). The 58-kD calmodulin-binding glutamate decarboxylase is a ubiquitous protein in petunia organs and its expression is developmentally regulated. *Plant Physiology*, 106, 1381–1387.

Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Barry, J., E. & Faure, D. (2006). GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7460-7464.

Cho, Y.R., Chang J.Y. & Chang, H.C (2007). Production of γ -amino-butyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 104-109.

Chung, H.J., Jang, S.H., Cho, H.Y. & Lim, S.T. (2009) Effects of steeping and anaerobic treatment on GABA (gamma-aminobutyric acid) content in germinated waxy hull-less barley. *LWT Food Science Technology*, 42, 1712–1716.

Coda, R., Rizzello, C. G. & Gobetti M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food Microbiology*, 137, 236–245.

- Comisión Europea, 2013. Commission recommendation of 8 November 2013 concerning the investigation of acrylamide levels in food. Official Journal of European Union, 301, 15-17, 2013/647/UE.
- Conner MT, Booth DA, Clifton VJ, Griffiths RP. (1988). Individualized optimization of the salt content of white bread for acceptability. *Journal of Food Science*, 5, 549–554.
- Cook, N. R., Obarzanek, E., Cutler, J.A., Buring, J.E., Rexrode, K.M., Kumanyika, S.K., Appel, L.J. & Whelton, P.K. (2009). Joint effects of sodium and potassium intake on subsequent cardiovascular disease: The Trials of Hypertension Prevention (TOHP) follow-up study. *Archives of Internal Medicine* 169(1): 32-40.
- Cotter, P.D. & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 429-453.
- Dai, S.F., Gao, F., Xu, X.L., Zhang, W.H., Song, S.X. & Zhou, G.H. (2012). Effects of dietary glutamine and gamma-aminobutyric acid on meat colour, pH, composition, and water-holding characteristic in broilers under cyclic heat stress. *British Poultry Science*, 53, 471–481.
- Dai-xin, H., Lu, Z., Lan, J., Li-te, L. & Yong-Qiang, C. (2008). Development of Laozao enriched with GABA. *Food Science and Technology*, 1, 22-25.
- DeFeudis, B. (1981). Muscimol binding and GABA receptors. *Drug Development Research*, 1, 93-105.
- Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizzello, C.G., Angelis, M.D.E., Giuliani, G., Meloni, M., Servi, B.D.E., Marco, G. (2009). Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 86, 731–741.
- Diana, M., Tres, A., Quílez, J., Llombart, M. & Rafecas, M. (2014). Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 351-355.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011). Biogenic amines in fermented foods. *EFSA J.* 9 (10), 2393.
- Fardet A, Leenhardt F, Lioger D, Scalbert A, Rémésy C. (2006). Parameters controlling the glycaemic response to breads. *Nutrition Research Reviews*, 19, 18–25.

Gallego, P., Whotton, L., Picton, S., Grierson, D. & Gray, J. (1995). A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening: the characteristics of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site. *Plant Molecular Biology*, 27, 1143–1151.

Gänzle, M-G., Loponen, J. & Gobbetti, M. (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science and Technology*, 19 (10), 513-521

Guang, C. & Phillips, R.D. (2009). Plant food derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agriculture and food chemistry*, 57, 5113-5120.

Guo, X.F., Aoki, H., Hagiwara, T., Masuda, K. & Watabe, S. (2009). Identification of high gamma-aminobutyric acid producing marine yeast strains by physiological and biochemical characteristics and gene sequence analyses. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 73, 1527–1534.

Han, D., Kim, H.Y., Lee, H.J., Shim, I., Hahm, D.H. (2007). Wound healing activity of gamma-aminobutyric Acid (GABA) in rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 (10), 1661-1669.

Hao R. & Schmit J.C., (1993). Cloning of the gene for glutamate decarboxylase and its expression during conidiation in *Neurospora crassa*. *Biochemistry Journal*, 293, 735–738.

Hattori, T., Tsusaki, S. & Tagaki, K. (2001). Food using γ -aminobutyric acid-enriched cruciferous plant. US6632458B1.

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

Hayakawa K., Ueno Y., Kawamura S., Taniguchi R. & Oda, K. (1997). Production of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria. *Seibutsu Kogaku*, 75, 239-244.

Hirose, N., Ujihara, K., Teruya, R., Maeda, G., Yoshitake, H., Wada, K. & Yoshimoto, M. (2008). Development of GABA-enhanced Lactic Acid Beverage using Sugar Cane and its Functionality. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 55, 209-214.

- Hiwatashi, K., Narisawa, A., Hokari, M. & Toeda, K. (2010). Antihypertensive effect of honey-based beverage containing fermented rice bran in spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 1, 40-43.
- Hu, F.J. & McGregor, G.A. (2002). Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. *Journal of Human Hypertension*, 16, 761-770.
- IARC, International Agency of Research on Cancer, 1994. Monograph 60 on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. Lyons.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasaom, M., Hayakawa, K., Kimura, M. & Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 490-495.
- Ito, K., Tanaka, K., Nishibe, Y., Hasegawa, J. & Ueno., H. (2007). GABA-synthesizing enzyme, GAD67, from dermal fibroblasts: Evidence for a new skin function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770 (2), 291–296.
- Jacob, H.E. (1994) Six thousand years of bread. Lyons and Burford, New York.
- Jannoey, P., Niamsup, H., Lumyong, S., Suzuki, T., Katayama, T. & Chairote, G. (2010). Comparison of gamma-aminobutyric acid production in Thai rice grains. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 26, 257–263.
- Jeng, K.C., Chen, C.S. & Fang, Y.P. (2007). Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in Pu-erh tea. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 55, 8787–8792.
- Jin, W., Kim, M & Kim, K. (2013). Utilization of Barley or Wheat Bran to Bioconvert Glutamate to γ -Aminobutyric Acid (GABA). *Journal of Food Science*, 78 (9), 1376–1382.
- Joye, I.J., Lamberts, L., Brijs, K. & Delcour, J.A. (2011). In situ production of γ -aminobutyric acid in breakfast cereals. *Food Chemistry*, 129, 395–401.
- Kajimoto, O., H. Hirata, S. Nakagawa, Y. Kajimoto, K. Hayakawa, and M.Kimura. (2004). Hypotensive effect of fermented milk containing g-amino butyric acid (GABA) in subjects with high normal blood pressure. *The Japanese Society for Food science and Technology*, 51, 79–86.

- Kanehira, T., Nakamura, Y., Nakamura, K., Horie, K., Horie, N., Furugori, K., Sauchi, Y. & Yokogoshi, H. (2011). Relieving occupational fatigue by consumption of a beverage containing γ -amino butyric acid. *Journal Nutrition Science Vitaminology*, 57 (1), 9-15.
- Karppanen, H. (1991). Minerals and blood pressure. *Annals of medicine* 23 (3), 299-305.
- Kayahara & Sugiura, 2001 Kayahara, H. & Sugiura, T. (2001). Research on physiological function of GABA in recent years-improvement function of brain function and anti-hypertension. *Japanese Journal of Food Development*, 36 (6), 4-6.
- Kazemi & Hoop, 1991Kazemi, H., Hoop, B. (1991) Glutamic acid and gamma-aminobutyric acid neurotransmitters in central control of breathing. *Journal Applied Physiology*, 70 (1), 1-7.
- Kelly & Saravanan, 2008 Kelly, C. & Saravanan, V. (2008). Treatment strategies for a rheumatoid arthritis patient with interstitial lung disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9, 3221-32230.
- Kim, J.Y., Lee, M.Y., Ji, G.E., Lee, Y.S. & Hwang, K.T. (2009). Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International Journal Food Microbiology*, 130, 12-16.
- Kim,Y., Lee, M., Kim, S., Kim, H., Chung, E., Lee, J. & Park., S. (2013) Accumulation of γ -aminobutyric acid and transcription of glutamate decarboxylase in *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Omics Journal*, 6 (4), 263-267.
- Kinefuchi, M., Sekiya, M., Yamazaki, A. & Yamamoto, K. (1999). Accumulation of GABA in brown rice by high pressure treatment: Manufacture of processed brown rice enriched with GABA accumulation using high pressure treatment. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 46, 323-328.
- Kleinrok, Z., Matuszek, M., Jesipowicz, J., Opolski, A. & Radzikowski, C. (1998). GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as S.C.tumors in a thymic nu/nu mice. *Journal Physiology Pharmacology*, 49, 303-310.
- Klijn, N., Weerkam, A.H. & de Vos, W.M. (1995). Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus spp.* in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 788.

- Ko, C., Victor Lin, H. & Tsai, G. (2013). Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*, 48, 559-568.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamotoa, S., Momosed, H., Kimurab, T. (2005). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22, 497–504.
- Konings, E., Baars, A., van Klaveren, J., Spanjer, M., Rensen, P., Hiemstra, M., van Kooij, J. & Peters, P., (2003). Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *Food Chemistry Toxicology*, 41, 1569-1579.
- Kook, M.C., Seo, M.J., Cheigh, C.I., Lee, S.J., Pyun, Y.R. & Park, H. (2010). Enhancement of gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2–16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal Korean Society Applied Biological Chemistry*, 53 (6), 816–820.
- Krystal, J.H., Sanacora, G., Blumberg, H., Anand, A., Charney, D.S., Marek, G., Epperson, C.N., Goddard, A., Mason, G.F. (2002). Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Molecular Psychiatry*, 7, 71-80.
- Kubicek, C. P., Hampel, W. & Rohr, M. (1979). Manganese deficiency leads to elevated amino acid pools in citric acid accumulating *Aspergillus niger*. *Archives of Microbiology*, 123, 73-79.
- Kuda, T., Tanibe, R., Mori, M., Take, H., Michihata, T. & Yano, T. (2009). Microbial and chemical properties of aji-no-susu, a traditional fermented fish with rice product in the Noto Peninsula, Japan. *Fish Science*, 75, 1499–1506.
- Kurata, K., Nagasawa, M., Tomonaga, S., Aoki, M., Morishita, K., Denbow, D. M & Furuse, M. (2011). Orally administered l-ornithine elevates brain l-ornithine levels and has an anxiolytic-like effect in mice. *Nutritional Neuroscience*, 14, 243-248.
- Lacroix, N., St-Gelais, D., Champagne, C. P. & Vuilleumard, J. C. (2013). Gamma-aminobutyric acid-producing abilities of lactococcal strains isolated from old-style cheese starters. *Dairy Science and Technology*, 9, 315–327.

- Lamberts, L., Joye, I., Beliën, T. & Delcour, J. (2012). Dynamics of γ -aminobutyric acid in wheat flour bread making. *Food Chemistry*, 130, 896-901.
- Lee, B.J., Kim, J.S., Kang, Y.M., Lim, J.H., Kim, Y.M., Lee, M.S., Jeong, M.H., Ahn, C.B. & Je, J.Y. (2010). Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods. *Food Chemistry*, 122 (1), 271-276.
- Leventhal, A., Wang, Y., Pu, M., Zhou, Y. & Ma, Y. (2003). GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science*, 300, 812-815.
- Li, H., Gao, D. & Xu, H. (2008). A high γ -aminobutyric acid-producing ability *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional poacai. *Annals of Microbiology*, 58, 649-653.
- Li, H., Qiu, T., Gao, D. & Cao, Y. (2009b). Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino Acids*. DOI: 10.1007/s00726-009-0355-3
- Li, J., Izumimoto, M., Yonehara, M., Hirotsu, S., Kuriki, T., Naito, I. & Yamada, H. (2009). The influence of fig proteases on the inhibition of angiotensin I-converting and GABA formation in meat. *Animal Science Journal*, 80 (6), 691-696.
- Li, Y., Bai, Q., Jin, X., Wen, H. & Gu, Z. (2010). Effects of cultivar and culture conditions on γ -aminobutyric acid accumulation in germinated fava beans (*Vicia faba* L.) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (1), 52-57.
- Liao, W. C., Wang, C. Y., Shyu, Y. T., Yu, R. C., & Ho, K. C. (2013). Influence of preprocessing methods and fermentation of adzuki beans on γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation by lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods*, 5 (3), 1108–1115.
- Liu, C. F., Tung, Y. T., Wu, C. L., Lee, B.-H., Hsu, W.-H., & Pan, T. M (2011). Antihypertensive effects of *Lactobacillus*-fermented milk orally administered to spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4537-4543.
- Lönner, C., Welander, T., Molin, N., Dostálek, N. & Blickstad, E. (1986). The microflora in a sourdough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food microbiology*, 3, 3-12.

- Lu, X., Chen, Z., Gu, Z. & Han, Y. (2008) Isolation of gamma-aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochemical Engineering Journal*, 41, 48–52.
- Mancia, G. (2013). Guía de práctica clínica de la ESH/ESC 2013 para el manejo de la hipertensión arterial. *Revista Española de Cardiología*, 66 (10), 4-91.
- Maras, B., Sweeney, G., Barra, D., Bossa, F., John, R.A. (1992). The amino acid sequence of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *European Journal Biochemistry*, 204, 93–98.
- Mardini, H., Jumaili, B., Record, C.O. & Burke, D. (1991). Effect of protein and lactulose on the production of gamma-aminobutyric acid by faecal *Escherichia coli*. *Gut*, 32, 1007–1010.
- Masuda, K., Guo, X., Uryu, N., Hagiwara, T. & Watabe, S. (2009). Isolation of Marine Yeasts collected from the Pacific Ocean Showing a High Production of γ -Aminobutyric Acid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71, 3265-3272.
- Matsubara, F., Ueno, H., Kentaro, T., Tadano, K., Suyama, T., Imaizumi, K., Suzuki, T., Magata, K., Kikuchi N. (2002) Effects of GABA supplementation on blood pressure and safety in adults with mild hypertension. *Japanese Pharmacology and Therapy*, 30, 963–972.
- Matsunaga, M., Saze, K., Matsunaga, T. & Suzuta, Y. (2009) Feedstuff and method for supply of gamma-aminobutyric acid. US 20090181121 A1.
- Minervini, F., Bilancia, M.T., Siragusa, S., Gobetti, M. & Caponio, F., (2009). Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology*, 26, 559-564.
- Minuk, G.Y. (2000). GABA and hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 207, 105–108.
- Mody, I., De Koninck, Y., Otis, T. S. & Soltesz, I. (1994). *Trends in neurosciences*, 17 (12), 517-525.
- Mohan, S. & Campbell, N.R.C. (2009). Salt and high blood pressure. *Clinical Science*, 117, 1-11.
- Mountfort, D.O. & Pybus, V. (1992). Effect of pH, temperature and salinity on the production of gamma-aminobutyric acid (GABA) from amines by marine bacteria. *FEMS Microbiology letters*, 101 (4), 237-244.

Nagaoka, H. (2005). Treatment of germinated wheat to increase levels of GABA and IP6 catalyzed by endogenous enzymes. *Biotechnology Progress*, 21, 405–410.

Nakamura, K., Nara, K., Noguchi, T., Ohshiro, T., Koga, H. (2006). Contents of gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in Potatoes and Processed Potato Products. *Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology-nippon*, 53 (9), 514-517.

Nakamura, H., Takishima, T., Kometani, T. & Yokogoshi, H. (2009). Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with gamma-aminobutyric acid (GABA) in humans: assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 60 (5), 106-113.

Nejati, F., Rizzello, C., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F. & Gobetti, M. (2013). Manufacture of a functional fermented milk enriched of angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and gamma-amino butyric acid (GABA). *LWT Food Sciences and Technology*, 51 (1), 183–189.

Noguchi, T., Nakamura, K., Nagai, T., Katsuda, S. & Koga, H. (2007). Antihypertensive Effects of GABA-Enriched Potato Snacks in Spontaneously Hypertensive Rats. *The Japanese Society for Food Science and Technology*, 54 (2), 75-81.

Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y. & Furukawa, S. (1998). Production of γ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 81, 1486–1491.

Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y. & Kobayashi, M. (1999). *Lactococcus lactis* contains only glutamate decarboxylase gene. *Microbiology*, 154, 1375–1380.

Oh, C.H. & Oh, S.H. (2004). Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 19-23.

Oh, S. H., Moon, Y.J. & Oh, C.H. (2003b). γ -Aminobutyric acid (GABA) content of selected uncooked foods. *Journal Food Sciences Nutrition*, 8, 75-78.

Oh, S. H. (2003). Stimulation of gamma-aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/Glu germination solution and calcium/calmodulin. *Journal Biochemistry Molecular Biology*, 36, 319–325.

- Oh, S. H., J. R. Soh & Y. S. Cha. (2003a). Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *Journal of Medicine Food*, 6, 115–121.
- Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R. & Takahashi, 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.
- Okita, Y., Nakamura, H., Kouda, K., Takahashi, I., Takaoka, T. & Kimura, M. (2009). Effects of vegetable containing gamma-aminobutyric acid on the cardiac autonomic nervous system in healthy young people. *Journal Physiology Anthropology*, 28, 101–107.
- Opolski, A., Mazurkiewicz, M., Wietrzyk, J., Kleinrok, Z. & Radzikowski, C. (2000). The role of GABA-ergic system in human mammary gland pathology and in growth of transplantable murine mammary cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 19 (3), 383-90.
- Park, K.B. & Oh, S.H. (2005). Production and characterization of GABA rice yogurt. *Food Science Biotechnology*, 14, 518–522.
- Park, K.B. & Oh, S.H. (2006a). Enhancement of gamma-aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 28, 1459–1463.
- Park, K.B. & Oh, S.H. (2007a). Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresource Technology*, 98, 312–319.
- Parkash, J. & Kaur, G. (2007a). Potential of PSA-NCAM in neuron-glia plasticity in the adult hypothalamus: Role of noradrenergic and GABAergic neurotransmitters. *Brain Research Bulletin*, 74, 317–328.
- Patil, S.B. & Khan, M.K. (2011). Germinated brown rice as a value added rice product: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 661–667.

- Petty, F. (1994). Plasma concentrations of gamma-aminobutyric acid (GABA) and mood disorders: a blood test for manic depressive disease? *Clinical Chemistry*, 40 (2), 296-302.
- Pinho, O., Ferreira, I., Mendes, E., Oliveira, B. & Ferreira, M. (2001) Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine during storage of Azeitao cheese. *Food Chemistry*, 75, 287-291.
- Pouliot Mathieu, K., Gardner-Fortier, C., Lemieux, S., St-Gelais, D., Champagne, C. P. & Vuilleumard, J-C. (2013). Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing acid lactic bacteria on blood pressure in men. *Pharmanutrition*, 1, 1-8.
- Pradeep, S.R., Manisha, G. & Malleshi, N.G (2011). Germinated mills and legumes as a source of gamma-aminobutyric acid. *World applied sciences journal*, 14 (1), 108-113.
- Rapkin, A. J. (1999). Progesterone, GABA and mood disorders in women. *Archives of women and men health*, 2, 97-105.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charenrjitrakul, W., Penjamras, P. & Chaiyasut, C. (2011). Enhancement of γ -aminobutyric acid in a fermented red seaweed beverage by starter culture *Lactobacillus plantarum* DW12. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14 (3), 0717-3458.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charenrjitrakul, W. & Sukhoom, A. (2013). Selection of γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and their potential as probiotics for use as starter cultures in Thai fermented sausages (Nham). *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1371–1382.
- Rehman, S.U., Paterson, A. & Piggot, J.R. (2006). Flavour in sourdough breads: a review. *Journal of Trends of Food Science and Technology*, 17, 557-566.
- Rizzello, C. G., Cassone, A., Di Cagno, R. & Gobbetti, M. (2008). Synthesis of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (16), 6936-43.
- Saez, M. & Barceló, M.A. (2012). Coste de la Hipertensión Arterial en España. *Hipertensión y riesgo cardiovascular*, 29 (4), 145-151.
- Saikusa, T., Horino, T. & Mori, Y. (1994). Accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 2291–2292.

- Salovaara H, Hellemann U, Kurkela R. (1982). Effect of salt on bread flavour. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 15, 270–274.
- Sasaki, S., Lee, L.C., Nakamura, Y., Iyota, I., Fukuyama, M., Inoue, A., Takeda, K., Yoshimura, M., Nakagawa, M., Ijichi, H. (1996). Hypotension and hypothalamic depression produced by intracerebroventricular injections of GABA in spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 50(11), 1140-8.
- Sasaki, S., Yokozawa, T., Cho, E.J., Oowada, S. & Kim, M. (2006). Protective role of γ -aminobutyric acid against chronic renal failure in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58 (11), 1515-1525.
- Schmit, J. C., Brody, S. (1975). *Neurospora crassa* conidial germination: role of endogenous amino acid pools. *Journal of Bacteriology*, 124, 232-242.
- Schuller, H.M., Al-Wadei, H.A. & Majidi, M. (2008). Gamma-aminobutyric acid, a potential tumor suppressor for small airway-derived lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 29 (10), 1979-85.
- Seidl, R., Cairns, N., Singewald, N., Kaehler, S.T. & Lubec, G. (2001). Differences between GABA levels in Alzheimer's disease and Down syndrome with Alzheimer-like neuropathology. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 363 (2), 139-45.
- Sentandreu, M, Á. & Toldrà, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nature protocols*, 1 (5), 2423-2427.
- J.H., Park, K.B., Kim, Y.H., Bae, M.O., Lee, M.K. & Oh, S.H. (2008). Production and characterization of kimchi with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid. *Food Science and Biotechnology*, 17, 940–946.
- Serraj, R., Shelp, B.J. & Sinclair, T.R. (1998). Accumulation of g-aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress. *Physiology Plant*, 102, 79–86.
- Shimizu, T. & Sawai, Y. (2008). Stability of Gamma-Aminobutyric Acid in Fruit Juice during Storage. *Food Preservation Science*, 34 (3), 145-149.

- Shi, F. & Li, Y. (2011). Synthesis of gamma-aminobutyric acid by expressing *Lactobacillus brevis*-derived glutamate decarboxylase in the *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032. *Biotechnology Letters*, 33, 2469-2474.
- Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T. & Matsubayashi, T. (2009). Anti-hypertensive effect of γ -aminobutyric acid (GABA)-rich *Chlorella* on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clinical and Experimental Hypertension*, 31, 342-354.
- Schousboe, A. & Waagepetersen, H. S. (2008). GABA neurotransmission: An overview. A. Lajtha. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology Neurotransmitter Systems*. Springer US, 214-221.
- Shu-cong, Z., Ting-ting, L., Tao-wei, Y., Hai-feng, X., Zhi-ming, R. (2010). Study on Separation and Purification Technology of γ -aminobutyric Acid by Whole-cell Bioconversion. *Food and fermentation industries*, 36 (11), 1-5.
- Shizuka, F., Kido, Y., Nakazawa, T., Kitajima, H., Aizawa, C., Kayamura, H. & Ichijo, N. (2004). Antihypertensive effect of gamma-amino butyric acid enriched soy products in spontaneously hypertensive rats. *Biofactors*, 22 (1-4), 165-167.
- Schmit, J. C., Brody, S. (1975). *Neurospora crassa* conidial germination: role of endogenous amino acid pools. *Journal of Bacteriology*, 124, 232-242.
- Solomon, P.S. & Oliver, R.P. (2001). The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta*, 213, 241-249.
- Song, Y., Shin, N. & Baik, S. (2014). Physicochemical and functional characteristics of a novel fermented pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves-based beverage using lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 23 (1), 187-194.
- Steward, F.C., Thompson, J. F. & Dent, C. E. (1949). γ -aminobutyric acid: a constituent of the potato tuber?. *Science*, 110, 439-440.
- Stolz, P. (2003). *Handbook of Dough Fermentations*. Marcel Dekker: New York

- Streeter, C.C., Jensen, J.E., Perlmutter, R.M., Cabral, H.J., Tian, H., Terhune, D.B., Ciraulo DA & Renshaw, P.F. (2007). Yoga Asana sessions increase brain GABA levels: a pilot study. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13 (4), 419-426.
- Su, Y.C., Wang, J.J., Lin, T.T. & Pan, T.M. (2003). Production of the secondary metabolites gamma-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 41-46.
- Su, M.T., Takeshi, K. & Tianyao, L. (2011). Isolation, characterization, and utilization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Myanmar fishery products fermented with boiled rice. *Fisheries Science*, 77 (2), 279.
- Sugino, T., Shirai, T., Kajimoto, Y., & Kajimoto, O., (2008). L-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutrition research*, 28, 738–43.
- Sun, T.S., Zhao, S.P., Wang, H.K., Cai, C.K., Chen, Y.F. & Zhang, H.P. (2009). ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *European Food Research and Technology*, 228, 607–612.
- Sun, B.S. (2004). Research of Some Physiological Active Substance by Fermentation of *Monascus spp.* [Dissertation for Master Degree.] Zhejiang Industry University, China, 40–55.
- Tamura, T., Noda, M., Ozaki, M., Maruyama, M., Matoba, Y., Kumagai, T. & Sugiyama M. (2010). Establishment of an efficient fermentation system of gamma-aminobutyric acid by a lactic acid bacterium, *Enterococcus avium* G-15, isolated from carrot leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(10), 1673-167.
- Tanaka, H., Watanabe, K., Ma, M., Hirayama, M., Kobayashi, T., Oyama, H. (2009). The effects of g-aminobutyric acid, vinegar, and dried bonito on blood pressure in normotensive and mildly or moderately hypertensive volunteers. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45, 93-100.
- Torino, M.I., Limón, R., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., Frías J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136, 1030-1037.

Tsai, J.S., Lin, Y.S., Pan, B.S. & Chen, T.J. (2006) Antihypertensive peptides and gamma-aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochemistry*, 41, 1282–1288.

Tsai, C., Chiu, T., Ho, C., Lin, P. & Wu, T. (2013). Effects of anti-hypertension and intestinal microflora of spontaneously hypertensive rats fed gamma aminobutyric acid-enriched Chingshey purple sweet potato fermented milk by lactic acid bacteria. *African Journal of Microbiological Research*, 7(11), 932-940.

Tsushida, T. & Murai, T. (1987). Conversion of glutamic acid to g-aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions. *Agricultural Biological Chemistry*, 51, 2865–2871.

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. *Journal of Nutrition and Science Vitaminology*, 55(1), 75-80.

Ueno, H. (2000). Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B Enzyme*, 10, 67–79.

Umekawa, H., Tatsuno, T., Wang, Y., Hirayama, M., Hattori, M. & Araki, T. (2008). Effect of *Porphyra* extract on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 10, 502-505.

Wallace, W., Secor, J. & Schrader, L. (1984). Rapid accumulation of g-aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiology*, 75, 170–175.

Wang, H. K., Dong, C., Chen, Y. F., Cui, L. M. & Zhang, H. P. (2009). A new probiotic cheddar cheese with high ACE-Inhibitory activity and γ -aminobutyric acid content produced with koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 61-70.

Wang, H.K., Dong, C., Chen, Y.F., Cui, L.M. & Zhang, H.P. (2010). A new probiotic Cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content produced with Koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 62-70.

- Warskulat, U., Reinen, A., Grether-Beck, S., Krutmann, J. & Häussinger, D. (2004). The osmolyte strategy of normal human Keratinocytes in maintaining cell homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 123, 516-521.
- Watanabe, Y., Hayakawa, K., & Ueno, H. (2011). Effects of co-culturing LAB on GABA production. *Journal of Biological Macromolecules*, 11 (1), 3-13.
- Watanabe, Y., Cornélissen, G., Watanabe, M., Watanabe, F., Otsuka, K., Ohkawa, S-I., Kikuchi, T., & Halberg, F. (2003). Effects of autogenic training and antihypertensive agents on circadian and circaseptan variation of blood pressure. *Clinical and Experimental Hypertension*, 25, 405-412.
- Wiens, S. C. & Trudeau, V.L. (2006). Thyroid hormone and γ -aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine Systems. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144, (3), 332-344.
- Wong, C.G., Bottiglieri, T. & Snead, O.C. (2003). GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology*, 54, (6), 3-12.
- Xu & Xia, 1999 Xu, C.W. & Xia, Y.H. (1999). Clinical observations on the control acute attack of deficiency-syndrome asthma with γ -aminobutyric acid. *Chinese Journal of Binzhou Medical College*, 22, 181.
- Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A., Matsuyama, A., Kikuchi, M. & Kawasaki, T. (2007). Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(1), 165-73.
- Yang, S., Lu, Z., Lu, F., Bie, X., Sun L. & Zeng X. (2006). Simple method for rapid screening of bacteria with glutamate decarboxylase activities. *Journal of Rapid Methods and Automation of Microbiology*, 14, 291-298.
- Yang, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R. & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by Lactic Acid Bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7283-7290.

- Yang, S.Y., Lu, F.X., Lu, Z.X., Bie, X.M., Jiao, Y., Sun, L.J. & Yu, B. (2008). Production of gamma-aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* Y2 under submerged fermentation. *Amino Acids*, 34, 473–478.
- Yang, N.C., Jhou, K.Y., Tseng, C.Y. (2012). Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 132 (4), 1796-1801.
- Yang, Z. (2003). GABA, a new player in the plant mating game. *Developmental Cell*, 5, 185–186.
- Yokoyama, S., Hiramatsu, J. & Hayakawa, K. (2002). Production of g- aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(1), 95-97.
- Yoshimura, M., Toyoshi, T., Sano, A., Izumi, T., Fujii, T., Konishi, C., Inai, S., Matsukura, C., Fukuda, N., Ezura, H. & Obata A. (2010). Antihypertensive effect of a γ -aminobutyric acid rich tomato cultivar ‘DG03-9’ in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 615–619.
- Yuko, W., Kiyoshi, H. & Hueno, H. (2011). Effects of co-culturing LAB on GABA production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 11 (1), 3-13.
- Zhang, H., Yao, H.Y. & Chen, F. (2006). Accumulation of gamma aminobutyric acid in rice germ using protease. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70, 1160–1165.
- Zhao, M., Ma, Y., Wei, Z.Z., Yuan, W.X., Li, Y.L., Zhang, C.H., Xue, X.T., Zhou, H.J. (2011). Determination and comparison of γ -aminobutyric acid (GABA) content in pu-erh and other types of Chinese tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (8), 3641–3648.