



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Optimización de la actividad de la enzima Diamino Oxidasa
procedente de algunas legumbres

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Miravalls Calpe, Eva

Tutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados

Cotutor/a: Hernando Hernando, María Isabel

Director/a Experimental: DUCH CALABUIG, AITANA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Título: Optimización de la actividad de la enzima diamino oxidasa procedente de algunas legumbres.

Resumen:

La histamina es una amina biógena, producto de la descarboxilación del aminoácido L-histidina, reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). En el ser humano, la histamina está involucrada en respuestas del sistema inmunitario, regula diversas funciones fisiológicas y actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central. En los alimentos, un sobrecrecimiento de bacterias con actividad descarboxilasa puede favorecer la degradación del aminoácido histidina y, por lo tanto, la formación de histamina. El consumo de estos alimentos puede producir una acumulación de histamina en el organismo y causar reacciones adversas como migrañas, cefaleas y dolor muscular, entre otras. La diamino oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6) es la principal enzima del metabolismo de la histamina ingerida. Esta enzima se localiza mayoritariamente en el epitelio intestinal, donde degrada de forma controlada la histamina ingerida. Cuando hay un déficit de DAO, se produce un desequilibrio en este mecanismo de regulación. Existen suplementos que contienen DAO procedente de riñón de cerdo, que permiten reducir los niveles de histamina en sangre entre un 12-14%. Sin embargo, este porcentaje de reducción es bajo y sería interesante obtener nuevas fuentes de DAO de elevada actividad enzimática. En este sentido, las legumbres se presentan como una alternativa interesante, ya que, presentan altos niveles de actividad enzimática de DAO y se ajustan a las tendencias actuales de los consumidores que prefieren consumir productos y derivados de origen vegetal. El objetivo de este trabajo es obtener un extracto procedente de legumbres, concretamente, guisantes y lentejas, con elevada actividad de la enzima DAO. Para ello, se determinará el periodo óptimo de germinación de las semillas de legumbre y las condiciones óptimas (pH y temperatura) de reacción de la enzima. Además, se evaluará el impacto de la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) sobre la actividad de la enzima DAO procedente de ambas legumbres. Los mayores valores de actividad enzimática se obtuvieron a los seis días de germinación y cuando la reacción enzimática tuvo lugar a pH 7,2 y 37°C de temperatura, en ambas legumbres. El tratamiento con PEF consiguió aumentar la actividad enzimática de la DAO en un 55 y un 125% en guisante y lenteja, respectivamente. La actividad de la DAO de origen vegetal, obtenida con y sin aplicación de PEF, presentó valores superiores a la de riñón de cerdo.

Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: ODS-3, Salud y bienestar; ODS-9, Industria, Innovación e Infraestructuras; ODS-12, Producción y consumo responsables; ODS-15, Vida de ecosistemas terrestres.

Palabras clave: enzima, histamina, lenteja, guisante, espectrofotometría, extracción enzimática, contenido en proteína, Bradford, PEF.

Title: Optimization of the activity of the diamine oxidase enzyme from some legumes.

Abstract:

Histamine is a biogenic amine, a product of the decarboxylation of the amino acid L-histidine, a reaction catalyzed by the enzyme L-histidine decarboxylase (EC.4.1.1.22). In humans, histamine is involved in immune system responses, regulates various physiological functions, and acts as a neurotransmitter in the central nervous system. In food, an overgrowth of bacteria with decarboxylase activity may promote the degradation of the amino acid histidine and thus the formation of histamine. The consumption of these foods can lead to an accumulation of histamine in the body and cause adverse reactions such as migraines, headaches, and muscle pain, among others. Diamine oxidase (DAO, EC.1.4.3.6) is the main enzyme involved in the metabolism of ingested histamine. This enzyme is mainly located in the intestinal epithelium, where it degrades ingested histamine in a controlled manner. When there is a DAO deficiency, there is an imbalance in this regulatory mechanism. Supplements containing DAO from pig kidney are available that can reduce blood histamine levels by 12-14%. However, this percentage reduction is low, and it would be interesting to obtain new sources of DAO with high enzymatic activity. In this respect, legumes are an interesting alternative, as they have high levels of DAO enzyme activity and are in line with current consumer trends towards plant-based products and derivatives. The aim of this work is to obtain an extract from legumes, specifically peas and lentils, with high DAO enzyme activity. To this end, this work establishes the optimal germination period of the legume seeds, the optimal conditions (pH and temperature) for the enzyme reaction and determines the impact of the application of Pulsed Electric Fields (PEF) on the activity of the DAO enzyme from both legumes. The highest enzyme activity values were obtained six days after germination and when the enzyme reaction took place at pH 7.2 and 37°C temperature, in both legumes. PEF treatment was able to increase DAO enzyme activity by 55 and 125% in pea and lentil, respectively. The activity of plant DAO, obtained with and without PEF application, showed higher values than that of pig kidney.

This work relates to the following SDGs of the 2030 Agenda: SDG-3, Good health and well-being; SDG-9, Industry, Innovation and Infrastructure; SDG-12, Responsible production and consumption; SDG-15, Life on land.

Keywords: enzyme, histamine, lentil, pea, spectrophotometry, enzyme extraction, protein content, Bradford, PEF.

Títol: Optimització de l'activitat de l'enzim diamino oxidasa procedent d'alguns llegums.

Resum:

La histamina és una amina biògena, producte de la descarboxilació de l'aminoàcid L-histidina, reacció catalitzada per l'enzim L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). En l'ésser humà, la histamina està involucrada en respostes del sistema immunitari, regula diverses funcions fisiològiques i actua com a neurotransmissor en el sistema nerviós central. En els aliments, un sobrecreixement de bacteris amb activitat descarboxilasa, pot afavorir la degradació de l'aminoàcid histidina i, per tant, la formació d'histamina. El consum d'aquests aliments pot produir una acumulació d'histamina en l'organisme i causar reaccions adverses com a migranyes, cefalees i dolor muscular, entre altres. La diamino oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6) és el principal enzim del metabolisme de la histamina ingerida. Aquest enzim es localitza, majoritàriament, en l'epiteli intestinal, on degrada, de manera controlada, la histamina ingerida. Quan hi ha un dèficit de DAO, es produeix un desequilibri en aquest mecanisme de regulació. Existeixen suplementes que contenen DAO procedent de renyó de porc, que permeten reduir els nivells d'histamina en sang entre un 12-14%. No obstant això, aquest percentatge de reducció és baix i seria interessant obtenir noves fonts de DAO d'elevada activitat enzimàtica. En aquest sentit, els llegums es presenten com una alternativa interessant, ja que presenten alts nivells d'activitat enzimàtica de DAO i s'ajusten a les tendències actuals dels consumidors que prefereixen consumir productes i derivats d'origen vegetal. L'objectiu d'aquest treball és obtenir un extracte procedent de llegums, concretament, pèsols i llentilles, amb elevada activitat de l'enzim DAO. Per a això, en aquest treball s'estableix el període òptim de germinació de les llavors de llegum, les condicions òptimes (pH i temperatura) de reacció de l'enzim i es determina l'impacte de l'aplicació de polsos elèctrics d'alt voltatge (PEF) sobre l'activitat de l'enzim DAO procedent de tots dos llegums. Els majors valors d'activitat enzimàtica es van obtenir als sis dies de germinació i quan la reacció enzimàtica va tindre lloc a pH 7,2 i 37 °C de temperatura, en tots dos llegums. El tractament amb PEF va aconseguir augmentar l'activitat enzimàtica de la DAO en un 55 i un 125% en pèsol i llentilla, respectivament. L'activitat de la DAO d'origen vegetal, obtinguda amb i sense aplicació de PEF, va presentar valors superiors a la de renyó de porc.

Aquest treball està relacionat amb els següents ODS de la Agenda 2030: ODS-3, Salut y benestar; ODS-9, Infraestructures; ODS-12, Producció y consum responsables; ODS-15, Vida de ecosistemes terrestres.

Paraules clau: enzim, histamina, llentilla, pèsol, espectrofotometria, extracció enzimàtica, contingut en proteïna, Bradford, PEF

Autor/a: Miravalls Calpe, Eva
Tutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados
Cotutor/a: Hernando Hernando, María Isabel
Director/a Experimental: Duch Calabuig, Aitana
Valencia, febrero de 2023

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en unas líneas, a todos aquellos que han hecho posible la realización de este trabajo.

Al equipo MIQUALI, en especial a la Dra. Empar Llorca, por su ayuda día a día en el laboratorio, por estar siempre disponible para cualquier duda y tener siempre una sonrisa y palabras de ánimo.

A mis tutoras, la Dra. Amparo Quiles y la Dra. Isabel Hernando por haberme dado la oportunidad de participar en este trabajo, por sus consejos y el tiempo invertido.

A mi directora experimental, Aitana Duch, por su ayuda, paciencia y dedicación. Estoy segura de que lograrás todo lo que te propongas.

A mi familia, en especial a mis padres, por haberme brindado la oportunidad de llegar hasta aquí y por su apoyo incondicional durante el camino.

A mi segunda familia, mis amigos, por estar siempre a mi lado. A los amigos que esta maravillosa carrera me ha dado la oportunidad de conocer por haberme regalado momentos inolvidables.

A José, por creer en mí cuando ni yo misma lo hacía.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HISTAMINA Y DÉFICIT DE DAO	1
1.1.1 Histamina	1
1.1.2. Histamina en los alimentos.....	1
1.1.3. Histaminosis	3
1.1.4. Déficit de diamino oxidasa	3
1.2. OBTENCIÓN DE DAO A PARTIR DE LEGUMINOSAS	5
1.3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE LEGUMINOSAS SOBRE LA DAO	6
1.4. TRATAMIENTO POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEF)	7
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	7
2.1. OBJETIVO GENERAL	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
2.3. PLAN DE TRABAJO	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1. MATERIA PRIMA	8
3.2. GERMINACIÓN	8
3.3. TRATAMIENTO CON PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEF)	9
3.3.1. Diseño experimental.....	9
3.3.2. Aplicación de los PEF.....	10
3.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	11
3.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	11
3.5.1. Fundamento de la reacción	11
3.5.2. Determinación de las condiciones óptimas de reacción	12
3.5.3. Determinación de la actividad enzimática	12
3.6.3. Determinación del contenido en proteína	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1. OPTIMIZACIÓN DEL PERIODO DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE LEGUMBRES	14
4.3. ANÁLISIS DEL EFECTO DE PEF PARA ESTIMULAR LA PRODUCCIÓN DE DAO	16
5. CONCLUSIÓN	20
6. BIBLIOGRAFÍA	21

<i>ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030.....</i>	<i>24</i>
<i>ANEXO II. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....</i>	<i>26</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis de la histamina por descarboxilación de la L-histidina (modificado a partir de Soria, 2018).....	1
Figura 2. Ruta metabólica de la histamina en humanos. DAO: diamino oxidasa; HNMT: histamina N-metiltransferasa; ALDH: aldehído deshidrogenasa; MAO: monoamino oxidasa. (modificado a partir de Comas-Basté et al., 2020b).....	4
Figura 3. Esquema de la regulación de la histamina en personas sanas (A), con una intoxicación por histamina (B) y con déficit de DAO (C) (modificado a partir de Comas-Basté et al., 2020b).....	5
Figura 4. Celda de tratamiento dentro de la urna de protección (A); Operador de interfaz (B).....	10
Figura 5. Celda de tratamiento con guisantes.....	11
Figura 6. Reacción enzimática (modificada a partir de Cebrián, 2018).	12
Figura 7. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre temperatura y pH para actividad enzimática específica (mU/mg proteína) de la DAO de extractos obtenidos a partir de guisantes germinados durante 6 días.....	16
Figura 8. Gráfica de interacción de actividad enzimática de la DAO en guisante versus voltaje aplicado según el número de pulsos utilizado.....	18
Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta para la actividad enzimática de extractos de guisante germinado durante seis días, tras la aplicación PEF con diferentes combinaciones de voltajes (V) y n° de pulsos.....	19
Figura 10. Gráfica de interacción de actividad enzimática de la DAO en lenteja versus voltaje aplicado según el número de pulsos utilizado.....	19
Figura 11. Gráfico de superficie de respuesta para la actividad enzimática de extractos de lenteja germinada durante seis días, tras la aplicación PEF con diferentes combinaciones de voltajes (V) y n° de pulsos.....	20
Figura suplementaria 1 (S1). Gráfica de medias de la actividad enzimática específica (mU/mg proteína) según los días de germinación del guisante.....	26
Figura suplementaria 2 (S2). Gráfica de medias de la actividad enzimática específica (mU/mg proteína) según los días de germinación de la lenteja.	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de histamina que presentan algunos alimentos (Veciana Nogués y Vidal Carou, 2008).....	2
Tabla 2. Principales síntomas de histaminosis (Comas-Basté et al., 2020b).....	3
Tabla 3. Diseño experimental de las condiciones de PEF.....	10
Tabla 4. Valores medios de actividad enzimática de la DAO obtenidos en guisante sometido a diferentes periodos de germinación.	14
Tabla 5. Valores medios de actividad enzimática de la DAO obtenidos en lenteja sometida a diferentes periodos de germinación.	15
Tabla 6. Valores medios de actividad enzimática de la DAO en guisantes sometidos a diferentes condiciones de PEF.....	17
Tabla 7. Valores medios de actividad enzimática de la dao en lentejas sometidas a diferentes condiciones de PEF.....	17
Tabla 8. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030.....	24
Tabla suplementaria 1 (S1). Análisis de la varianza multifactorial para la actividad enzimática específica con los factores temperatura y pH de reacción.....	27
Tabla suplementaria 2 (S2). Análisis de la varianza para la actividad enzimática específica de extractos de guisante germinado durante seis días, tras la aplicación de PEF con diferentes combinaciones de voltajes (V) y n° de pulsos	27
Tabla suplementaria 3 (S3). Análisis de la varianza para la actividad enzimática específica de extractos de lenteja germinado durante seis días, tras la aplicación de PEF con diferentes combinaciones de voltajes (V) y n° de pulsos	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Histamina y déficit de DAO

1.1.1 Histamina

La histamina, es una amina biógena formada a partir de la descarboxilación de su precursor, el aminoácido L-histidina (Figura 1), reacción que está catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22) (Comas-Basté et al., 2020a). La histamina de origen endógeno es sintetizada en el organismo y la histamina exógena se obtiene a partir de los alimentos y llega al torrente sanguíneo a través de su absorción en el intestino delgado.

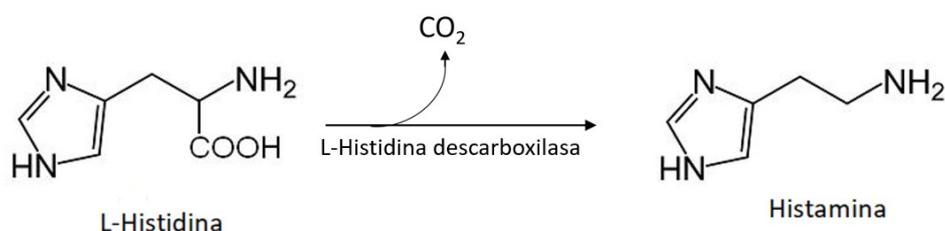


Figura 1. Síntesis de la histamina por descarboxilación de la L-histidina (modificado a partir de Soria, 2018).

Las principales funciones de la histamina en nuestro organismo son:

- **Función de Señalización:** la histamina se libera como respuesta del sistema inmune ante posibles peligros como virus o bacterias. Sin embargo, en ocasiones, el sistema inmunitario reacciona de forma exagerada ante sustancias inofensivas provocando una reacción alérgica (Fernández, 2018).
- **Función Neurotransmisora:** la histamina es indispensable para regular los ciclos del sueño, consolidar la memoria, modificar los niveles de estrés, coordinar las funciones sexuales y controlar la síntesis de otros neurotransmisores (Bertran Prieto, 2020).

1.1.2. Histamina en los alimentos

La presencia de histamina en pequeñas cantidades, en algunos alimentos, puede considerarse normal, tanto en productos de origen animal como en productos de origen vegetal (Veciana Nogués y Vidal Carou, 2008). La formación de histamina en los alimentos requiere de la disponibilidad de aminoácidos libres, en concreto de histidina; algunos pescados como el atún, la sardina o el boquerón presentan altas concentraciones de histidina. Otro factor importante es la presencia en el alimento de microorganismos

descarboxilasa-positivos, es decir, capaces de transformar la histidina en histamina; es el caso de los productos fermentados y madurados, como el queso, la cerveza o el vino. Además, la formación de histamina se ve favorecida en condiciones que permiten el crecimiento bacteriano y la actividad descaboxilasa, como las altas temperaturas y los pH bajos (Maintz y Novak, 2007). Las condiciones poco higiénicas también favorecen la formación de histamina (*Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*, 2022). Sin embargo, la congelación o la refrigeración a una temperatura menor de 4°C minimiza la formación de histamina.

En los alimentos frescos, la fracción de aminoácidos libres, generalmente, es poco importante, pero pueden aumentar con el deterioro (Veciana Nogués y Vidal Carou, 2008) o debido a procesos de proteólisis durante el procesado o el almacenamiento (Maintz y Novak, 2007). Por ello, los alimentos que suelen presentar cantidades más elevadas de histamina son, principalmente, los productos más susceptibles al deterioro microbiológico, como carnes y pescados, o alimentos y bebidas elaborados por fermentación/ maduración. La Tabla 1 muestra el contenido en histamina en algunos alimentos (Veciana Nogués y Vidal Carou, 2008):

Tabla 1. Cantidad de histamina que presentan algunos alimentos (Veciana Nogués y Vidal Carou, 2008).

Alimento	Contenido en histamina (mg/Kg)
Pescado azul	
Fresco	ND-10
Semiconserva	ND-2.400
Conserva	ND-1.500
Carne	
Fresca	ND-4
Cárnicos curados (jamón, chorizo, fuet)	ND-10
Cárnicos cocidos (jamón, mortadela)	ND-5
Lácteos	
Leche, yogur	ND-13
Quesos madurados (manchego, parmesano)	ND-700
Vegetales	
Frescos (espinacas, acelgas, tomate)	0'5-50
Fermentados (chucrut, derivados de soja)	ND-2.300
Bebidas alcohólicas	
Vino tinto	ND-13
Vino blanco	ND-21
Cerveza	ND-2

ND: No Detectado

La histamina, una vez generada en los alimentos, es difícil de eliminar, ya que es resistente a los tratamientos térmicos; además, su presencia no es detectada por los consumidores en los alimentos al

no alterar sus propiedades organolépticas (*Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2022*).

1.1.3. Histaminosis

La histaminosis es el término empleado para describir situaciones en las que se produce una acumulación de histamina en el organismo. Esta puede ser debida a una producción excesiva de histamina por parte del organismo o a la ingestión de cantidades inusualmente altas de histamina procedente de los alimentos (Ojeda, 2020). También puede producirse por la incapacidad de metabolizar la histamina, incluso en concentraciones normales o bajas.

Los síntomas más comunes producidos por la histaminosis son similares a los desarrollados ante una reacción alérgica, aunque a menudo, más leves. La manifestación de esta sintomatología, en la mayoría de los casos, remite en pocas horas y no siempre aparecen todos los síntomas (Veciana Nogués y Vidal Carou, 2008). Los síntomas más comunes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales síntomas de histaminosis (Comas-Basté et al., 2020b).

Sistema afectado	Síntomas
Respiratorio	Congestión nasal, asma, fatiga.
Cardiovascular	Taquicardia, hipotensión, hipertensión y arritmias.
Epitelial	Prurito, urticaria, hinchazón, piel atópica, psoriasis.
Sistema Nervioso Central	Migrañas, cefaleas, mareos.
Digestivo	Estreñimiento, diarrea, dolor de estómago, vómitos, distensión abdominal.
Muscular	Fibromialgia, dolor muscular.

1.1.4. Déficit de diamino oxidasa

La enzima diamino oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6) se encuentra en el tracto digestivo, principalmente, en el intestino delgado y es la responsable de metabolizar la histamina exógena. Cuando la histamina ingerida procedente de los alimentos llega al intestino, sufre una reacción denominada desaminación oxidativa, que es catalizada por la enzima DAO, en la que se obtiene imidazol acetaldehído, una sustancia que puede ser excretada por la orina (Comas-Basté et al., 2020b).

En el caso de la histamina endógena, la enzima encargada de su metabolización es la histamina N-metiltransferasa (HNMT) y como producto de reacción se obtiene N-metilhistamina, que también puede ser excretada por la orina (International Society of DAO Deficiency, s. f.).

La acción conjunta de estas dos enzimas (Figura 2) logra mantener el equilibrio en el sistema de regulación de la histamina, permitiendo que se elimine correctamente del organismo.

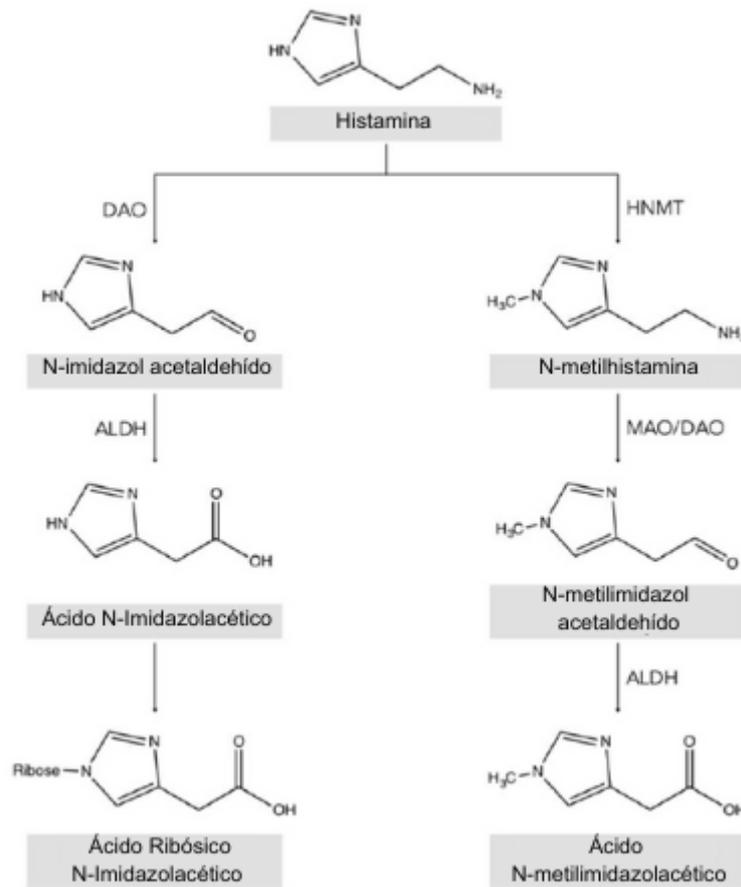


Figura 2. Ruta metabólica de la histamina en humanos. DAO: diamino oxidasa; HNMT: Histamina N-metiltransferasa; ALDH: aldehído deshidrogenasa; MAO: monoamino oxidasa. (modificado a partir de Comas-Basté et al., 2020b).

El déficit de la enzima DAO se presenta como una disminución de la actividad de la enzima diamino oxidasa en el intestino delgado, produciendo una alteración en el metabolismo de la histamina alimentaria. El origen de la deficiencia en la síntesis de DAO puede ser genético o adquirido. En caso de ser adquirido, existen varios factores que producen una disminución en la actividad enzimática, como enfermedades inflamatorias intestinales, el consumo de fármacos que bloquean la enzima DAO o el consumo de bebidas alcohólicas y otras sustancias tóxicas para el organismo (Fontan, 2019).

El déficit de DAO es la principal causa de intolerancia a la histamina, ya que, cuando no existe suficiente disponibilidad de esta enzima, la histamina no puede metabolizarse lo suficientemente rápido y eliminarse a través de la orina, por lo que se produce un desequilibrio en el sistema regulador. La histamina, entonces, es absorbida en el intestino delgado, dónde pasa al torrente sanguíneo y va

acumulándose en el plasma sanguíneo (Figura 3). Finalmente, se distribuye por los receptores que se encuentran en la superficie de algunos tejidos y órganos, desencadenando síntomas por todo el organismo (Valero, 2018).

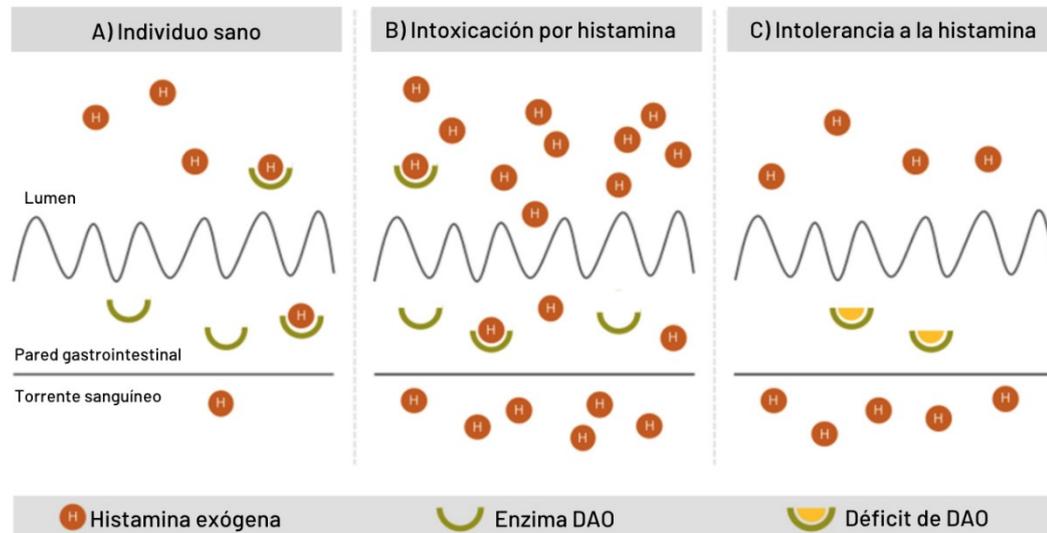


Figura 3. Esquema de la regulación de la histamina en personas sanas (A), con una intoxicación por histamina (B) y con déficit de DAO (C) (modificado a partir de Comas-Basté et al., 2020b).

Con el fin de reducir los síntomas debidos a un déficit de DAO y, por tanto, tratar la intolerancia a la histamina, existen dos posibles soluciones:

- Llevar una dieta baja en histamina: consiste en seguir una dieta muy restrictiva en la que se eliminan numerosos alimentos.
- Tomar suplementos comerciales que contienen DAO: consiste en tomar suplementos de enzima DAO extraída de riñón de cerdo con una actividad enzimática específica de 50 mU/mg proteína. Estos suplementos tienen una baja eficacia, ya que tan solo son capaces de metabolizar entre un 12-14% de la histamina que llega al intestino procedente del alimento, por lo que, la mayoría de las veces, es conveniente combinarlos con una dieta baja en histamina (Kettner et al., 2020). Además, esta opción no cumple con los requisitos de las dietas exentas de productos animales que, cada vez más, adoptan y prefieren los consumidores.

1.2. Obtención de DAO a partir de leguminosas

En los últimos años, los estudios sobre la presencia de histamina en los alimentos han despertado un gran interés en la comunidad científica debido a su elevado potencial tóxico y a que está presente en un gran número de alimentos (Comas-Basté et al., 2020a). Se estima que aproximadamente un 1% de la

población sufre intolerancia a la histamina (Kettner et al., 2020). Como ya se ha comentado en el apartado anterior, los suplementos comerciales que contienen DAO de origen animal tienen una baja eficacia en cuanto a reducción de histamina. Esto ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de DAO.

La obtención de extractos vegetales de alta actividad de enzima DAO podría suponer una alternativa interesante a los suplementos comerciales de DAO de origen animal que existen en la actualidad. Estos extractos vegetales podrían satisfacer las exigencias de un sector más amplio de la población al seguir la tendencia actual de los consumidores que, cada vez más, prefieren productos de origen vegetal. Los alimentos de origen vegetal que presentan mayor actividad de DAO son las legumbres. Algunos autores como Yang et al. (2012) o Comas-Basté et al. (2020a) han investigado acerca de la actividad enzimática de la DAO extraída de algunas legumbres como el garbanzo (*Cicer arietinum L.*), el haba (*Vicia faba L.*), la judía común (*Phaseolus vulgaris L.*), el guisante (*Pisum sativum L.*) o la lenteja (*Lens culinaris*) entre otras, obteniendo resultados prometedores. La producción de diamino oxidasa incrementa a partir del tercer día de germinación y puede aumentar hasta el décimo, a partir del cual disminuye drásticamente (Gibb, 2014).

1.3. Influencia de las condiciones de germinación de las semillas de leguminosas sobre la DAO

Las condiciones de germinación, como la presencia o ausencia de luz, la temperatura y la humedad relativa del aire tienen diferentes efectos sobre los brotes, variando considerablemente entre especies y variedades de plantas (Vu et al., 2023).

Presencia o ausencia de luz

La luz es un factor esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ello, la ausencia de luz puede actuar como una condición de estrés para la semilla e inducir un incremento de la producción de la enzima DAO (Yang et al., 2011). Según algunos estudios (Choudhary y Singh, 1997), la actividad de la DAO fue significativamente mayor en los brotes de legumbres que crecieron en oscuridad que en los germinados con presencia de luz. Además, algunos autores (Federico et al., 1985) demostraron que, tanto la actividad enzimática de la DAO como la cantidad de proteína enzimática, disminuyeron más lentamente en la oscuridad que en la luz.

Temperatura

La temperatura interviene en el crecimiento de las plantas durante la germinación. A temperaturas demasiado bajas o elevadas, puede producirse una germinación deficiente. Según algunos autores (Motsa et al., 2015), el rango de temperaturas óptimas para la germinación de las leguminosas se encuentra entre 25 y 31°C.

Humedad

La humedad relativa del aire tiene un efecto importante en el metabolismo de las plantas durante la germinación. Una humedad relativa elevada induce una mayor tasa de germinación y una mejor calidad nutricional (Vu et al., 2023). De acuerdo con algunos estudios (Jung et al., 2020), germinar las semillas con una humedad relativa del 80% mejora el crecimiento y el desarrollo de las semillas, lo que podría suponer también un aumento de la actividad enzimática.

1.4. Tratamiento por pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF)

El tratamiento mediante pulsos eléctricos de alto voltaje (Pulsed Electric Fields, PEF) consiste en la aplicación intermitente de voltajes elevados durante un periodo de tiempo corto (microsegundos) a un alimento (Martín Municio, 2018). El alimento se coloca en una celda entre dos electrodos y se le aplica una diferencia de potencial. Dicha diferencia genera un campo eléctrico que, a su vez, provoca un fenómeno conocido como electroporación (Menor García, 2019).

La electroporación consiste en la formación de poros en las membranas celulares que, como consecuencia, produce un incremento de la permeabilidad de las membranas al paso de iones y macromoléculas. Este fenómeno facilita la extracción de componentes intracelulares de interés reduciendo el tiempo de extracción y mejorando el rendimiento (Martín Municio, 2018).

Algunos autores (Mahajan y Pandey, 2014) han demostrado que la aplicación de PEF puede aumentar el poder germinativo en algunas semillas, lo que podría significar un incremento de la actividad enzimática de la enzima DAO.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es obtener extractos procedentes de guisante y lenteja, con elevada actividad de la enzima DAO.

2.2. Objetivos específicos

Para lograr el objetivo general, se plantearon varios objetivos específicos:

1. Optimizar el periodo de germinación de las semillas de legumbres.
2. Optimizar las condiciones de pH y temperatura de la reacción enzimática catalizada por la DAO, empleando como DAO de referencia la obtenida a partir de guisante germinado durante 6 días.

3. Determinar el impacto de la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) en semillas de guisantes y lentejas sobre la producción y actividad de la DAO.

2.3. Plan de trabajo

Para alcanzar los objetivos planteados se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Revisión de estudios previos sobre: histamina, histaminosis, enzima diamino oxidasa (DAO), métodos de extracción y análisis de la enzima DAO y producción de la enzima por parte de legumbres.
2. Determinación de la actividad enzimática de DAO y del contenido en proteína en extractos de guisantes y lentejas sometidos a germinación durante 3, 6 y 9 días.
3. Determinación de la actividad enzimática de la DAO, en extractos procedentes de guisantes germinados durante 6 días, empleando como sustrato histamina y bajo diferentes condiciones de reacción, concretamente, diferentes pH (4,5,6,7) y dos temperaturas (20°C y 37°C).
4. Aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF), a las semillas de legumbres (guisantes y lentejas), antes de la germinación, utilizando diferentes combinaciones (diseño experimental) de voltaje (3.000, 6.500 y 10.000 V) y número de pulsos (10, 55 y 100).
5. Determinación de la actividad enzimática de la DAO en los extractos de los germinados de legumbres (guisantes y lentejas) sometidas a las diferentes condiciones de PEF.
6. Determinación del contenido en proteína en los extractos de los germinados de legumbres (guisantes y lentejas) sometidas a las diferentes condiciones de PEF.
7. Análisis y discusión de los resultados obtenidos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materia prima

Para este trabajo, se emplearon dos tipos de legumbres: guisantes forrajeros (*Pisum sativum*), proporcionados por la Fábrica de Piensos del Departamento de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València y lentejas (*Lens culinaris*) procedentes de un mercado local. Las legumbres se conservaron envasadas al vacío y en refrigeración (4°C), protegidas de la luz y la humedad hasta su utilización.

3.2. Germinación

La germinación, tanto de los guisantes como de las lentejas, se realizó siempre en condiciones de oscuridad para someter a las semillas a estrés y favorecer la síntesis de la enzima diamino oxidasa.

Para germinar las semillas, primero, se colocó papel de filtro humedecido con agua en el interior de recipientes de vidrio herméticos. Sobre el papel de filtro, se depositaron de manera uniforme las semillas de las legumbres, que habían sido previamente mantenidas en remojo con agua destilada durante 12 h y, a continuación, se recubrieron con un segundo papel de filtro, también humedecido. Además, en los recipientes se introdujo una disolución sobresaturada de NaCl (40 g) y agua destilada (12 mL) para mantener una humedad constante del 80% (Simatos y Multon, 1985). Finalmente, se taparon los recipientes dejando la válvula, ubicada en la parte superior de la tapa del recipiente, abierta para facilitar el intercambio de gases. Los recipientes se mantuvieron en oscuridad dentro de una cámara de germinación a una temperatura constante de 27°C (Comas-Basté et al., 2020a).

Para establecer el tiempo de germinación óptimo, es decir, aquel en el que la actividad de la DAO de los brotes de las leguminosas es máxima, las legumbres se germinaron durante tres, seis y nueve días. Una vez transcurrido el tiempo de germinación establecido, las muestras se congelaron y liofilizaron durante 48 h para asegurar una eliminación total del agua en la legumbre, evitando una posible degradación de la enzima. Por último, los brotes liofilizados se trituraron con un molinillo y se tamizaron para obtener un polvo fino y homogéneo. El polvo obtenido se envasó a vacío y se conservó en congelación a -80°C hasta su uso.

3.3. Tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF)

Para determinar el impacto de los PEF sobre la actividad de la enzima DAO, las semillas de leguminosas se sometieron a diferentes condiciones de PEF. Estas condiciones se obtuvieron mediante un diseño experimental.

3.3.1. Diseño experimental

Con la ayuda del programa Statgraphics Centurion XVIII (StatPoint Technologies Inc. USA), se creó un diseño Factorial de 3 niveles (3^2) para estudiar los efectos de 2 factores (número de pulsos eléctricos y voltaje). El orden de los experimentos fue aleatorizado por el programa estadístico (Tabla 3).

Para el ensayo, se optó por utilizar 3.000V (voltaje mínimo con el que se obtuvo diferencia), 10.000 V (máximo aplicable) y 6.500 V (punto medio entre el mínimo y el máximo) con la finalidad de acotar al máximo el rango posible de voltaje aplicable. Además, también se pusieron a prueba el número de pulsos aplicados (10, 55 y 100 pulsos).

Tabla 3. *Diseño experimental de las condiciones de PEF.*

<i>Orden de ejecución</i>	<i>Voltaje (V)</i>	<i>Número de pulsos</i>
1	3.000	55
2	6.500	10
3	6.500	55
4	6.500	100
5	10.000	10
6	3.000	10
7	10.000	55
8	3.000	100
9	10.000	100

3.3.2. Aplicación de los PEF

La aplicación de los PEF se realizó tras someter las legumbres a 12 h de remojo y antes de colocar las semillas dentro de la cámara de germinación. Para ello, primero se preparó la celda de tratamiento que consta de dos electrodos, uno de entrada y otro de salida. La distancia de separación utilizada entre los electrodos fue de 10 cm. Después, se añadieron las semillas de legumbres a la celda y se cubrieron con 150 mL de agua del grifo. El agua del grifo contiene iones y sales minerales ionizadas, es decir, cargadas eléctricamente, que facilitan el paso de la corriente. Tras añadir el agua, la celda se colocó dentro de la urna de protección (Figura 4A) del operador de interfaz modelo EPULSUS PM1-10 (Energy Pulse Systems) (Figura 4B) y se conectaron los conectores a los electrodos. Para finalizar, se aplicó el tratamiento multi-pulsos, con un ancho de pulso (10 μ s) y frecuencia (10 Hz) constantes, y el voltaje (3.000, 6.500 y 10.000 V) y el número de pulsos (10, 55 y 100) deseados. En la figura 5 se puede ver, a modo de ejemplo, la celda de tratamiento con los guisantes.

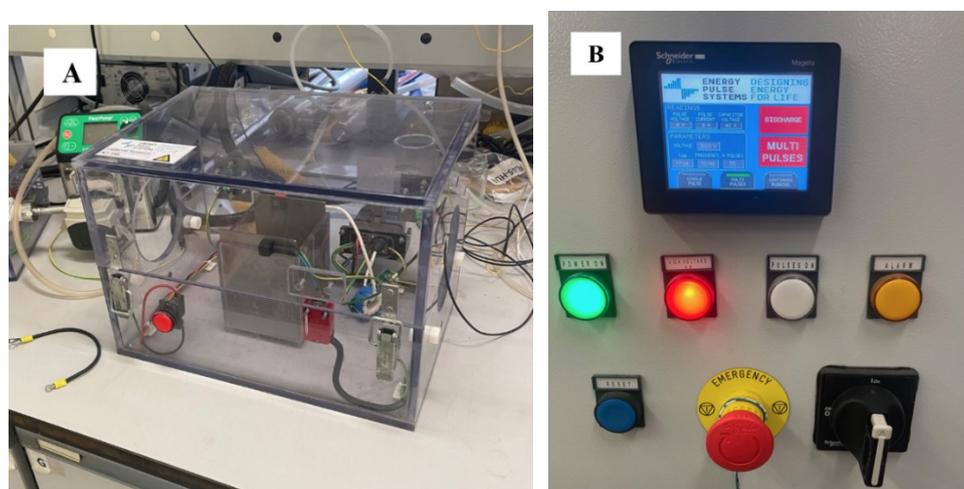


Figura 4. *Celda de tratamiento dentro de la urna de protección (A); Operador de interfaz (B).*

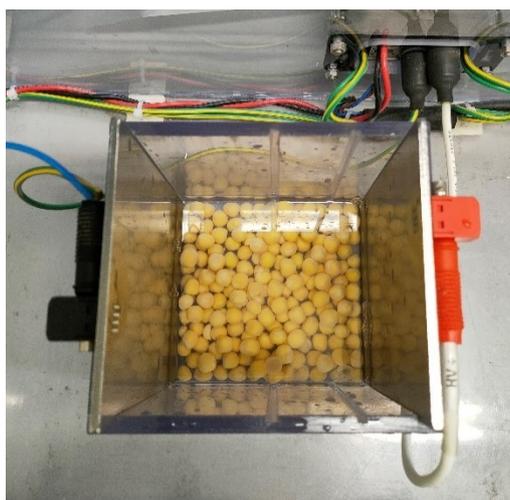


Figura 5. Celda de tratamiento con guisantes.

3.4. Obtención de extractos

Para determinar la actividad enzimática de la DAO y el contenido en proteína de los germinados de legumbres, se obtuvieron previamente extractos a partir de los polvos de los brotes de legumbre liofilizados. Para ello, se pesaron en tubos de centrifuga 4 g de polvo y se añadieron 12 mL de tampón fosfato con glicerol (pH 6,5). Para la preparación del tampón, se utilizó glicerol 100% (100 mL/L tampón) y un tampón fosfato (0,07M; pH 6,5) preparado a partir de fosfato diácido de potasio (0,07M) y fosfato disódico (0,07 M) (Yang et al., 2012).

Los tubos con la muestra y el tampón se mantuvieron durante 30 min en agitación a 4°C y, a continuación, se sometieron a centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se recogió en un matraz de 50 mL y se mantuvo a 4°C. El pellet se sometió de nuevo a centrifugación utilizando el mismo procedimiento. Este proceso se repitió 3 veces. El contenido del matraz, con el sobrenadante obtenido de las 3 repeticiones, se enrasó a 50 mL con la disolución tampón y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis (Yang et al., 2012).

3.5. Determinación de la actividad enzimática

3.5.1. Fundamento de la reacción

Las reacciones enzimáticas para la determinación de la actividad de la diamino oxidasa utilizadas en este trabajo se basan en una serie de reacciones redox, en las que se produce una señal analítica (cambio de coloración) fácilmente detectable, debido al cambio del estado de oxidación de una de las sustancias (DA-67), que permite relacionar la cantidad de sustrato degradado (histamina) por acción de la enzima DAO, con el cambio de coloración (Cebrián, 2018). El colorante utilizado (DA-67), es incoloro en su forma reducida y, una vez oxidado, produce un color azulado, cuyo máximo de absorbancia es

detectable en el espectrofotómetro a 668 nm. La reacción enzimática global estudiada se divide en dos reacciones en serie que son las siguientes:

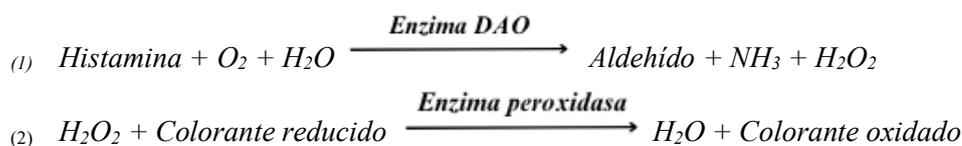


Figura 6. Reacción enzimática (modificada a partir de Cebrián, 2018).

- (1) La enzima diamino oxidasa (DAO) cataliza la reacción entre la histamina y el oxígeno, generando peróxido de hidrógeno.
- (2) La enzima peroxidasa (POD) cataliza la reacción entre el peróxido de hidrógeno formado en la primera reacción y la forma reducida del compuesto colorante (DA-67), generando agua y oxígeno. Este último oxida el colorante, produciendo un cambio de coloración.

3.5.2. Determinación de las condiciones óptimas de reacción

Según diversos estudios (Kettner et al., 2020; Takagi et al., 1994), las condiciones óptimas de reacción de la enzima diamino oxidasa procedente de riñón de cerdo son 37°C y un pH de 7,2. Para establecer las condiciones óptimas de reacción de la DAO procedente de legumbres se decidió tomar estas condiciones como punto de partida y, sobre ellas, realizar variaciones de pH y temperatura. Concretamente, la reacción enzimática se llevó a cabo a pH 4, 5, 6 y 7 y a 20 y 37°C de temperatura. Todas las determinaciones se realizaron con polvo de guisante sometido a un periodo de germinación de 6 días.

3.5.3. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó utilizando el ensayo enzimático colorimétrico con DA-67 e histamina como sustrato. Primero, se pusieron en eppendorfs de 1,5 mL, 750 µL de una disolución de histamina (1 mM; disuelta en PIPES 25 mM y pH 7,2) y 726 µL de DA-67 (50 µM; disuelta en PIPES 25 mM y pH 7,2). La mezcla se homogeneizó y se dejó en un baño con agua a 37°C durante 10 min. A continuación, se añadieron 24 µL de peroxidasa (POD) (266 U/mL; disuelta en PIPES 25 mM y pH 7,2) y se inició la reacción añadiendo 50 µL del extracto de las muestras obtenido anteriormente. De nuevo, se homogeneizó la muestra y se metió en un baño a 37°C durante 10 min. Al finalizar el tiempo, la reacción se paró con la adición de 50 µL de dietilditiocarbamato sódico (30 mM). Después, los eppendorf se centrifugaron (10.000 x g, durante 3 min a 20°C) y se midió la absorbancia del sobrenadante a 668 nm en el espectrofotómetro Thermo Scientific Helios Zeta (Kettner et al., 2020).

La actividad enzimática se calculó con ayuda de una recta de calibrado. Para la obtención de la recta, se prepararon disoluciones con diferentes concentraciones (entre 0,5 y 10 nmol/mL) de H₂O₂. Después, se siguió el procedimiento descrito anteriormente, sustituyendo los 750 µL de histamina iniciales por los 750 µL del tampón ácido piperazidina etanosulfónico (PIPES; 25 mM) y los 50 µL de muestra por 50 µL de las disoluciones de H₂O₂ preparadas anteriormente. Finalmente, se representó en una gráfica la concentración de las disoluciones de H₂O₂ frente a la absorbancia (Kettner et al., 2020).

Para evitar posibles interferencias en la reacción enzimática de aminas biógenas que pudieran estar presentes en los extractos, se preparó una referencia por cada muestra estudiada, en la que se sustituyó la disolución de histamina por 750 µL de tampón PIPES (25 mM y pH 7,2) (Kettner et al., 2020). La medida de absorbancia obtenida en las referencias fue restada de la medida de absorbancia obtenida en las muestras para eliminar las reacciones producidas por otros compuestos.

La actividad enzimática específica de la DAO se expresó como mU/mg proteína.

3.6.3. Determinación del contenido en proteína

El contenido en proteína se determinó mediante el método de Bradford, una técnica colorimétrica basada en medir la variación de absorbancia producida por la interacción de las proteínas de una disolución con el reactivo de Bradford, preparado a partir del colorante azul brillante de Coomassie G-250 (Bradford, 1976).

Para la preparación del reactivo colorante, se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie en 50 mL de etanol 95%. Después, se añadieron 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v) y se enrasó hasta 1L con agua destilada (Bradford, 1976).

Para determinar el contenido en proteína, se introdujeron 100 µL de extracto de polvo de legumbre germinada en un tubo de ensayo y se le añadió 1 mL de reactivo de Bradford. A continuación, la mezcla se agitó en un vórtex, se dejó reaccionar durante 2 min y se midió en un espectrofotómetro Thermo Scientific Helios Zeta, a una longitud de onda de 595 nm. Además, en todas las determinaciones se prepararon blancos en los que se sustituyó la muestra por 100 µL del tampón fosfato con glicerol (pH 6,5) utilizado en la obtención del extracto.

El contenido en proteína se calculó con ayuda de una recta de calibrado. Para la obtención de la recta, se prepararon disoluciones con diferentes cantidades conocidas de proteína de albúmina de suero bovina (BSA) (entre 10 y 100 µg). Después, se pipetearon 100 µL de las disoluciones preparadas y se les añadió 1 mL del reactivo de Bradford. Tras 2 min, se midieron en el espectrofotómetro, las absorbancias de

todas las disoluciones a 595 nm y se representaron en una gráfica frente a la concentración de las disoluciones de BSA (Bradford, 1976).

3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics Centurion XVIII (StatPoint Technologies Inc., USA). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) simple para el estudio del tiempo de germinación y un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para la optimización de las condiciones de pH y temperatura para la determinación de la actividad enzimática de la DAO procedente de legumbres. Para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras se utilizó el método LSD (Least Significant Difference), a un nivel de confianza del 95% (p -valor $< 0,05$). Además, para determinar el impacto de la aplicación de PEF sobre la actividad enzimática se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta; los factores estudiados fueron el voltaje y número de pulsos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del periodo de germinación de las semillas de legumbres

Para establecer el tiempo de germinación óptimo de las semillas de guisantes y lentejas se determinó la actividad enzimática de la DAO en los extractos obtenidos a partir del polvo liofilizado de los brotes de legumbres germinadas durante tres, seis y nueve días. En las tablas 4 y 5 se muestran los valores medios obtenidos de actividad enzimática específica (mU/mg proteína) para los diferentes días de germinación estudiados en las muestras procedentes de guisantes y lentejas.

Tabla 4. Valores medios de actividad enzimática de la DAO obtenidos en guisante sometido a diferentes periodos de germinación.

Legumbre	Periodo de germinación (días)	Actividad enzimática específica (mU/mg proteína)
Guisante	3	58,14 ^a ± 2,75
	6	262,52 ^c ± 7,37
	9	189,77 ^b ± 12,11

Diferentes letras minúsculas en superíndice indican valores con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,5$) para el factor días de germinación.

Tabla 5. Valores medios de actividad enzimática de la DAO obtenidos en lenteja sometida a diferentes periodos de germinación.

Legumbre	Periodo de germinación (días)	Actividad enzimática específica (mU/mg proteína)
Lenteja	3	100,42 ^a ± 7,09
	6	139,72 ^b ± 14,92
	9	100,79 ^a ± 7,11

Diferentes letras minúsculas en superíndice indican valores con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,5$) para el factor días de germinación.

Como se puede observar, la actividad de la DAO fue significativamente ($p > 0,05$) más elevada a los seis días de germinación en los extractos obtenidos a partir de ambas legumbres. En los extractos de guisante, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todos los días de germinación, obteniéndose los menores valores de actividad a los tres días. En el caso de las lentejas, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tres y los nueve días de germinación. En el Anexo II se incluye como material suplementario los gráficos de medias de estos valores (Figuras suplementarias S1 y S2).

Por tanto, el resultado de este análisis determinó que la actividad enzimática a los seis días de germinación fue significativamente ($p < 0,05$) más elevada que para el resto de días, tanto en guisantes como en lentejas. Esto podría deberse a que la síntesis enzimática toma comienzo en torno a los tres días de germinación, por lo que la cantidad de enzima presente va aumentando hasta el sexto día, en el que alcanza su máximo, probablemente a partir de este día la enzima empieza a degradarse.

Si se compara la actividad enzimática de la DAO de legumbres con la de riñón de cerdo (50 mU/mg proteína), se puede observar que la procedente de guisante (262,52 mU/mg proteína) y la de lenteja (139,72 mU/mg proteína) presentaron un 425% y un 180%, más actividad que la de origen animal, respectivamente.

4.2. Optimización de las condiciones de reacción de la DAO

Para establecer las condiciones óptimas de la reacción catalizada por la DAO se tomó como legumbre de referencia el extracto procedente de guisantes sometidos a un periodo de germinación de seis días. Se determinó la actividad enzimática bajo diferentes condiciones de temperatura (20 y 37°C) y pH (4,5,6,7). Ambos factores, temperatura y pH, presentaron efectos significativos sobre la actividad enzimática, y, además, hubo interacciones entre ambos factores para los valores de actividad enzimática (Figura 7). En el Anexo II como material suplementario se presenta la tabla con el análisis de la varianza

multifactorial para la actividad enzimática con los factores temperatura y pH de reacción (Tabla suplementaria S1).

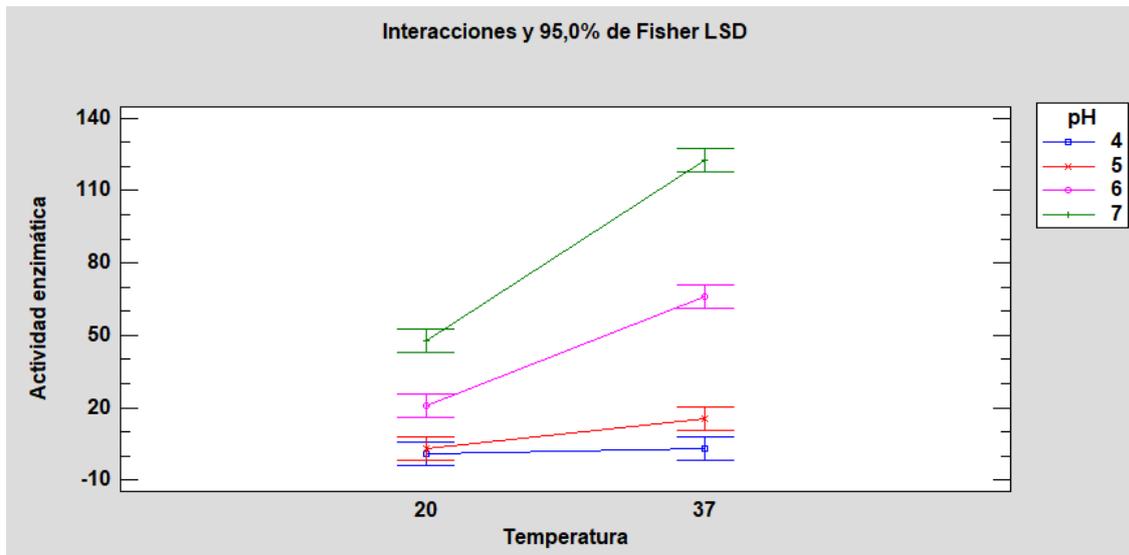


Figura 7. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre temperatura y pH para actividad enzimática específica (mU/mg proteína) de la DAO de extractos obtenidos a partir de guisantes germinados durante 6 días.

Como se puede observar, los valores de actividad enzimática fueron significativamente ($p < 0,05$) más elevados cuando la reacción enzimática tuvo lugar a una temperatura de 37°C y un pH de 7. Cuando la reacción enzimática tuvo lugar a pH 4 y 5 los valores de actividad enzimática fueron significativamente ($p < 0,05$) los más bajos para ambas temperaturas de reacción. A pH 5, 6 y 7 los valores de actividad enzimática de la DAO fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) cuando la reacción tuvo lugar a 37 grados.

Por tanto, estos resultados muestran que las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción enzimática de la enzima DAO procedente de legumbres utilizando histamina como sustrato son 37°C de temperatura y un pH 7. Estas condiciones coinciden con las utilizadas para medir la actividad enzimática de DAO procedente de riñón de cerdo, utilizadas por Kettner et al. (2020) y Takagi et al. (1994) en trabajos anteriores.

4.3. Análisis del efecto de PEF para estimular la producción de DAO.

Para conocer el impacto del tratamiento con PEF, se determinó la actividad enzimática de la DAO en los extractos de legumbres germinadas durante seis días, ya que, como indica el apartado 4.1, es el tiempo de germinación idóneo para conseguir una mayor producción de DAO.

En las tablas 6 y 7 se muestran los valores medios de actividad enzimática (mU/mg de proteína) obtenidos para guisante y lenteja, respectivamente, según el tratamiento de PEF aplicado.

Tabla 6. Valores medios de actividad enzimática de la DAO en guisantes sometidos a diferentes condiciones de PEF.

Voltaje (V)	Nº de pulsos	Actividad enzimática específica (mU/mg proteína)
3.000	10	242,13 ± 5,55
	55	129,15 ± 11,42
	100	254,40 ± 2,59
6.500	10	212,91 ± 7,14
	55	30,57 ± 0,96
	100	148,38 ± 4,13
10.000	10	407,98 ± 8,34
	55	0 ± 0*
	100	148,17 ± 1,77

*La muestra no germinó.

Tabla 7. Valores medios de actividad enzimática de la DAO en lentejas sometidas a diferentes condiciones de PEF.

Voltaje (V)	Nº de pulsos	Actividad enzimática específica (mU/mg proteína)
3.000	10	189,56± 3,95
	55	313,97 ± 10,62
	100	150,09 ± 6,61
6.500	10	156,41 ± 13,82
	55	5,26 ± 0,07
	100	33,40 ± 1,11
10.000	10	137,66 ± 5,83
	55	0 ± 0*
	100	2,53 ± 0,52

*La muestra no germinó.

Si comparamos los resultados de actividad enzimática específica obtenidos en guisante tratado con PEF y el resultado de actividad de DAO obtenido en guisantes germinados sin aplicación de pulsos eléctricos, se puede observar que, el tratamiento de 10.000V y 10 pulsos, consiguió aumentar la síntesis de DAO en un 55%. En el caso de lentejas germinadas, la aplicación de un tratamiento de 3.000V y 55

pulsos, consiguió aumentar la síntesis de DAO en un 124%. En el Anexo II, como material suplementario, se presentan las tablas con el análisis de la varianza para la actividad enzimática de extractos de guisante y lenteja, respectivamente, germinados durante seis días, tras la aplicación PEF con diferentes combinaciones de voltajes (V) y nº de pulsos (Tablas suplementarias S2 y S3).

A partir de los valores de actividad enzimática específica de DAO obtenidos, se realizó el análisis estadístico para cada legumbre empleando la metodología de superficie de respuesta, en el que se estudiaron los factores voltaje y número de pulsos.

Los resultados obtenidos tras aplicar este modelo de análisis estadístico en guisante se muestran en las figuras 8 y 9. La figura 8, muestra la gráfica de interacción entre los factores para los valores de actividad enzimática específica y la figura 9, el gráfico de superficie de respuesta estimada. Se puede apreciar que, para valores de voltajes altos, la síntesis de DAO no dependió únicamente del voltaje aplicado, sino también del número de pulsos empleado; para un menor número de pulsos se obtuvo una mayor actividad enzimática. Sin embargo, para voltajes bajos, la síntesis de DAO fue menos dependiente del número de pulsos empleado. Según este modelo, las condiciones óptimas de PEF a aplicar en guisantes, serían voltajes de 10.000 V o superiores y un número de pulsos igual o inferior a 10.

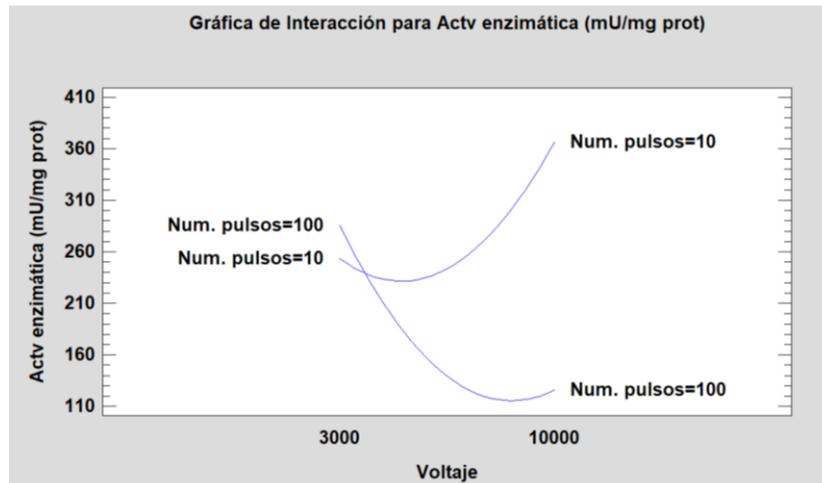


Figura 8. Gráfica de Interacción de actividad enzimática de la DAO en guisante versus voltaje aplicado según el número de pulsos utilizado.

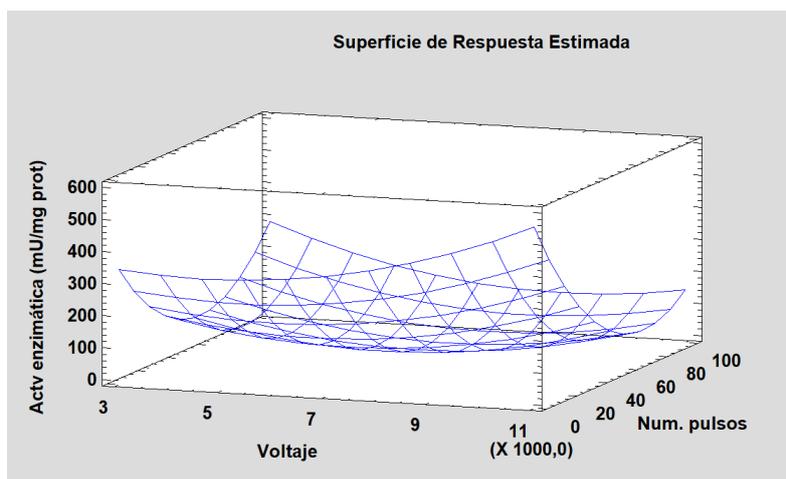


Figura 9. Gráfico de Superficie de Respuesta para la actividad enzimática de extractos de guisante germinado durante seis días, tras la aplicación PEF con diferentes combinaciones de voltajes (V) y n° de pulsos.

En el caso de la lenteja, los resultados de actividad enzimática de la DAO obtenidos tras realizar el análisis de superficie de respuesta se muestran en las figuras 10 y 11. Como se puede observar, a menor voltaje se obtuvo una mayor actividad enzimática. Asimismo, el número de pulsos, a voltajes bajos, no influyó en la síntesis de DAO. Las condiciones óptimas de PEF para esta legumbre, se encontraron a voltajes iguales o inferiores a 3000V, independientemente del número de pulsos empleados.

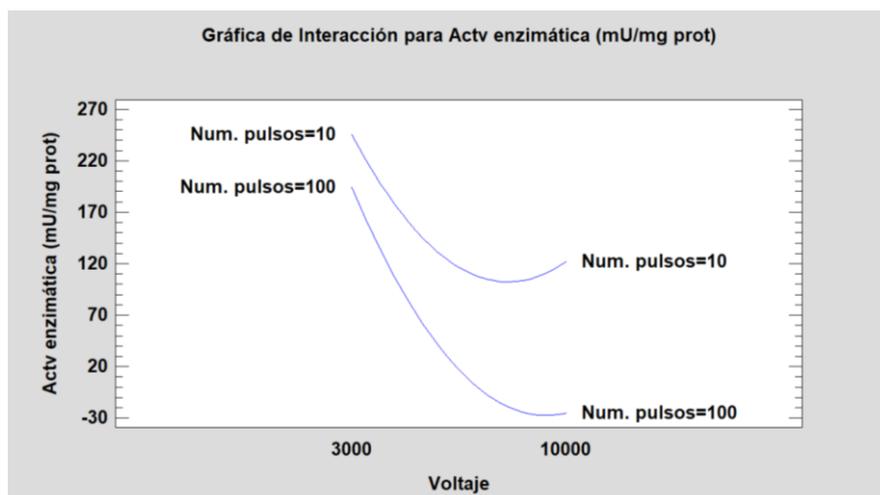


Figura 10. Gráfica de Interacción de actividad enzimática de la DAO en lenteja versus voltaje aplicado según el número de pulsos utilizado.

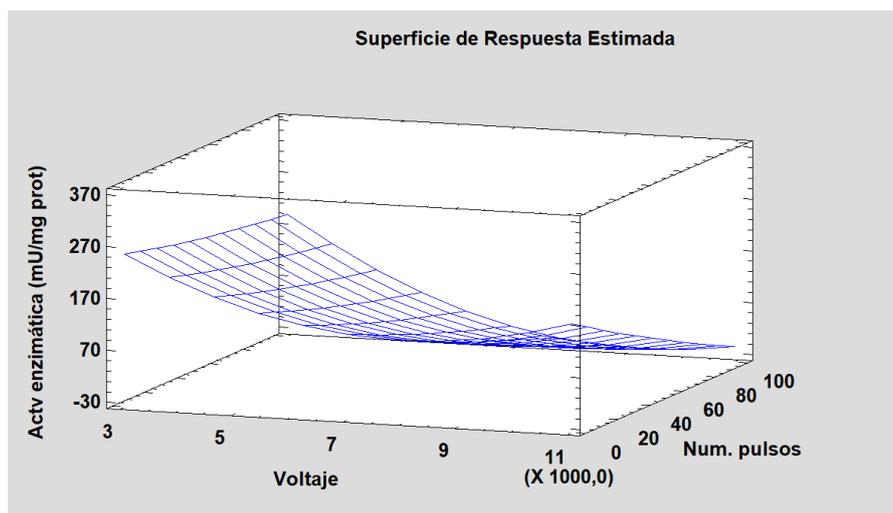


Figura 11. Gráfico de Superficie de Respuesta para la actividad enzimática de extractos de lenteja germinada durante seis días, tras la aplicación PEF con diferentes combinaciones de voltajes (V) y n° de pulsos.

Si se compara la actividad enzimática de la DAO obtenida de legumbres tratadas con PEF con la de la DAO animal (50 mU/mg proteína), se puede observar que la de guisante sometida a 10.000 V y 10 pulsos supuso un aumento del 716%, y la de lenteja tratada con 3.000 V y 55 pulsos un aumento del 527%.

5. CONCLUSIÓN

El periodo de germinación óptimo de las semillas de legumbres, guisantes y lentejas, para obtener extractos con elevada actividad de la enzima DAO es de seis días. Cuando la reacción enzimática de la DAO tiene lugar a 37°C y un pH de 7 se consiguen los mayores valores de actividad enzimática; estas condiciones son las más adecuadas, por tanto, para realizar las determinaciones de la actividad enzimática. La DAO procedente de legumbres, presenta valores de actividad enzimática superiores a los de la de riñón de cerdo, concretamente, la de guisante un 425% y la de lenteja un 180% más de actividad. La aplicación de PEF permite aumentar la actividad de la DAO en guisantes (10.000 V y 10 pulsos) en un 55% y en lentejas (3000 V y 55 pulsos) en un 125%. Las condiciones óptimas para aumentar la síntesis de DAO en semillas de guisante podrían alcanzarse con voltajes iguales o superiores a 10.000V y un número de pulsos igual o inferior a 10. Las condiciones óptimas para aumentar la síntesis de DAO en semillas de lenteja podrían llegar a alcanzarse con voltajes iguales o inferiores a 3.000V, independientemente del número de pulsos. Estos resultados permiten confirmar que las legumbres son una buena fuente de DAO e invitan a seguir investigando para obtener extractos vegetales ricos en DAO que permitan controlar los niveles de histamina que llega al organismo a través de los alimentos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Seguridad Alimentaria. (27 de junio de 2022). *Intoxicación por histamina en alimentos*. Ministerio de consumo. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/histamina.htm

Bertran Prieto, P. (14 de agosto de 2020). *Histamina (neurotransmisor): Qué es funciones y características*. MédicoPlus. <https://medicoplus.com/neurologia/histamina>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cebrián Aznárez, P. A. (2019). *Desarrollo de test enzimático para la determinación de aminas biógenas* [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Zaragoza. <https://zagan.unizar.es/record/86539?ln=es>

Choudhary, A., y Singh, R. P. (1997). Distribution of Cu²⁺-diamine oxidase during ontogeny of seedlings of *Vigna radiata* cultivars. *Biologia Plantarum*, 40(3), 449-452. <https://doi.org/10.1023/A:1001134518316>

Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M. T., y Vidal-Carou, M. C. (2020a). Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance. *LWT*, 125, 109201. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109201>

Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M., y Vidal-Carou, M. del C. (2020b). Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/biom10081181>

Federico, R., Angelini, R., Cesta, A., y Pini, C. (1985). Determination of Diamine Oxidase in Lentil Seedlings by Enzymic Activity and Immunoreactivity. *Plant physiology*, 79, 62-64. <https://doi.org/10.1104/pp.79.1.62>

Fernández, R. (2018). *Histamina: De lo que está hecha la alergia*. MedlinePlus. <https://medlineplus.gov/spanish/videos-de-medlineplus/histamina-de-lo-que-esta-hecha-la-alergia/>

Fontan, B. (20 de febrero de 2019). *¿Conoces el déficit de DAO?* Quirónsalud. <https://www.quironsalud.es/es/comunicacion/notas-prensa/conoces-deficit-dao>

Gibb, J. (1 de octubre de 2014). *Natural Sources of DAO*. Low histamine. <https://www.low-histamine.com/tag/pea-sprouts/>

International Society of DAO Deficiency. (s. f.). *Histamina en los alimentos*. <https://www.deficitdao.org/el-deficit-de-dao/la-histamina/histamina-en-los-alimentos/>

Jung, E., Sivakumar, S., Hong, S.-C., Yi, P.-I., Jang, S.-H., y Suh, J. (2020). Influence of Relative Humidity on Germination and Metal Accumulation in *Vigna radiata* Exposed to Metal-based Nanoparticles. *Sustainability*, 12(4), 1347. <https://doi.org/10.3390/su12041347>

Kettner, L., Seitzl, I., y Fischer, L. (2020). Evaluation of porcine diamine oxidase for the conversion of histamine in food-relevant amounts. *Journal of Food Science*, 85(3), 843-852. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15069>

Mahajan, T. S., y Pandey, O. P. (2014). Effect of electric field (at different temperatures) on germination of chickpea seed. *African Journal of Biotechnology*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13345>

Maintz, L., y Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1185-1196. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>

Martín Muncio, E. (2018). *Aplicaciones de los pulsos eléctricos de alto voltaje para el procesado y conservación de alimentos* [Trabajo Fin de Grado]. Universidad de Zaragoza. <https://zaguan.unizar.es/record/76795?ln=es#>

Menor García, L. (2019). *Intensificación de la extracción de betanina en remolacha roja mediante ultrasonidos y pulsos eléctricos* [Trabajo Fin de Grado]. Universitat Politècnica de València. <https://riunet.upv.es/handle/10251/121680>

Motsa, M. M., Slabbert, M. M., van Averbek, W., y Morey, L. (2015). Effect of light and temperature on seed germination of selected African leafy vegetables. *South African Journal of Botany*, 99, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.03.185>

Ojeda, I. (8 de diciembre de 2020). *Histaminosis no alérgica: Déficit DAO y otras causas*. Clínica Ojeda. <https://clinicaojeda.es/intolerancias-alimentarias/histaminosis-no-alergica-deficit-de-dao-y-otras-causas/>

Simatos, D., y Multon, J. L. (Eds.). (1985). *Properties of Water in Foods*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5103-7>

Soria, M. (25 de abril de 2018). La ciencia que se esconde detrás de las alergias (I): Histamina y antihistamínicos. *Siempre con ciencia*. <http://siempreconciencia.blogspot.com/2015/04/la-ciencia-que-se-esconde-detras-de-las.html>

Takagi, K., Nakao, M., Ogura, Y., Nabeshima, T., y Kunii, A. (1994). Sensitive colorimetric assay of serum diamine oxidase. *Clinica Chimica Acta*, 226(1), 67-75. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(94)90103-1)

Valero, D. (28 de agosto de 2018). Alimentos funcionales para suplir la deficiencia de la enzima intestinal DAO: El remedio contra las migrañas. *InspiraBiotech*. <https://inspirabiotech.com/2018/08/28/complementos-y-alimentos-funcionales-para-suplir-la-deficiencia-de-la-enzima-dao-el-remedio-contra-las-migranas/>

Veciana Nogués, M. T., y Vidal Carou, M. C. (2008). Dieta baja en histamina. *Nutrición y dietética clínica*. (2ª), (45), 443-448. Elsevier España. <https://www.deficitdao.org/wp-content/uploads/2018/12/002a-Dieta-Baja-en-histamina.pdf>

Vu, T. A., Kha, C. T., y Phan, T. H. (2023). The changes in Gamma-aminobutyric acid and polyphenols in mung beans (*Vigna radiata* L.) during germination. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1155(1), 012024. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1155/1/012024>

Yang, R., Chen, H., y Gu, Z. (2011). Factors Influencing Diamine Oxidase Activity and γ -Aminobutyric Acid Content of Fava Bean (*Vicia faba* L.) during Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11616-11620. <https://doi.org/10.1021/jf202645p>

Yang, R., Chen, H., Han, Y., y Gu, Z. (2012). Purification of diamine oxidase and its properties in germinated fava bean (*Vicia faba* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1709-1715. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5536>

ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

El desarrollo de una nueva alternativa vegetal al tratamiento actual de la deficiencia de DAO puede contribuir significativamente a varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por la ONU.

Tabla 8. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030.

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructura.	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.		X		
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.		X		X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

En cuanto a los ODS con un mayor grado de relación con este trabajo destacan:

ODS 3 – Salud y bienestar.

Al desarrollar una alternativa al actual tratamiento para la intolerancia a la histamina, que es más eficiente metabolizando la histamina y más sostenible, ya que está elaborado a base de enzima diamino oxidasa extraída de legumbres. Además, este nuevo tratamiento a base de legumbres podría satisfacer las exigencias de un sector más amplio de la población al alinearse a las exigencias de aquellos consumidores prefieren consumir productos de origen vegetal.

ODS 9 – Industria, Innovación e Infraestructura.

El desarrollo de un nuevo tratamiento para la intolerancia a la histamina promueve la innovación y la investigación, además de la búsqueda de alternativas más eficientes y sostenibles.

ODS 12 – Producción y consumo responsables.

Al utilizarse materia prima de origen vegetal, al contrario que la alterativa actual, elaborada a base de riñón de cerdo. El sector cárnico es uno de los que más contribuye al cambio climático, ya que emite el 14'5% de las emisiones globales de gases de efecto invernadero.

ODS 15 – Vida de ecosistemas terrestres.

Al utilizarse materia prima de origen vegetal, al contrario que la alterativa actual, elaborada a base de riñón de cerdo. Un 66% de las tierras cultivadas en España y entre el 75-80% de las áreas utilizadas mundialmente para la agricultura son destinadas a alimentación animal. Además, el 80% de la deforestación mundial se debe a la expansión de esta, debida a los esfuerzos de la Industria Agroalimentaria por satisfacer la demanda de una población que crece a velocidad exponencial.

En conclusión, el desarrollo de un nuevo tratamiento a la intolerancia a la histamina a base de enzima diamino oxidasa extraída de legumbres contribuye a lograr varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenibles (ODS) establecidos por la ONU, creando alternativas más eficientes y sostenibles y fomentando la innovación.

ANEXO II. MATERIAL SUPLEMENTARIO

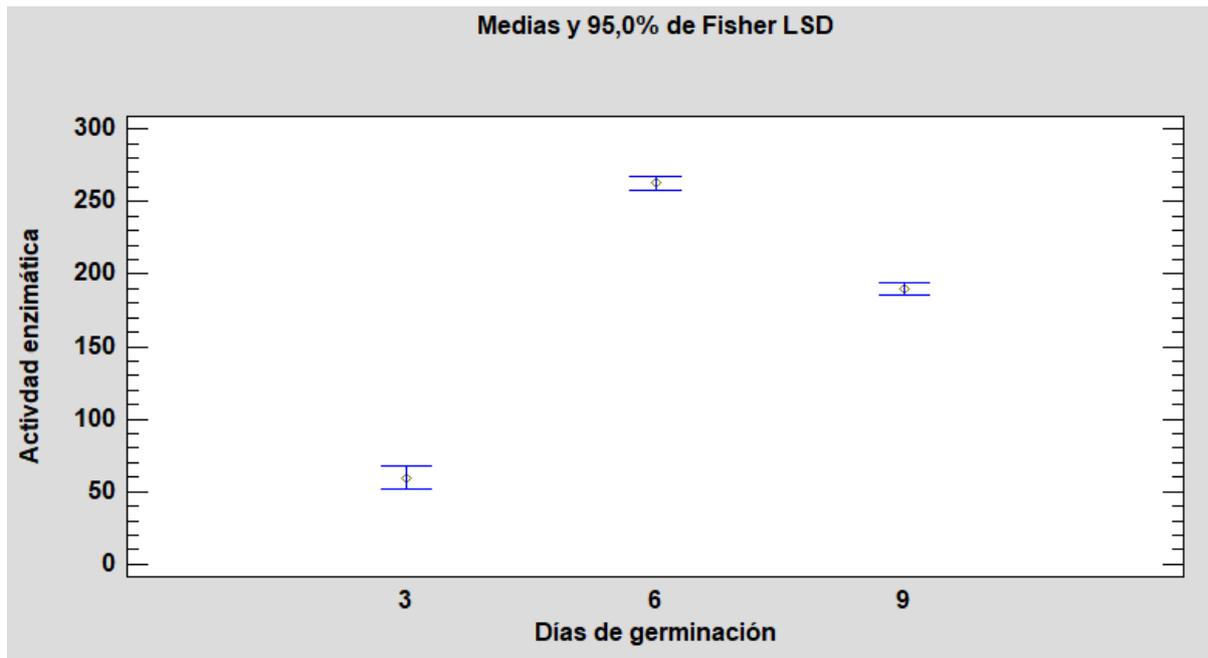


Figura Suplementaria 1 (S1). Gráfica de medias de la actividad enzimática específica (mU/mg proteína) según los días de germinación del guisante.

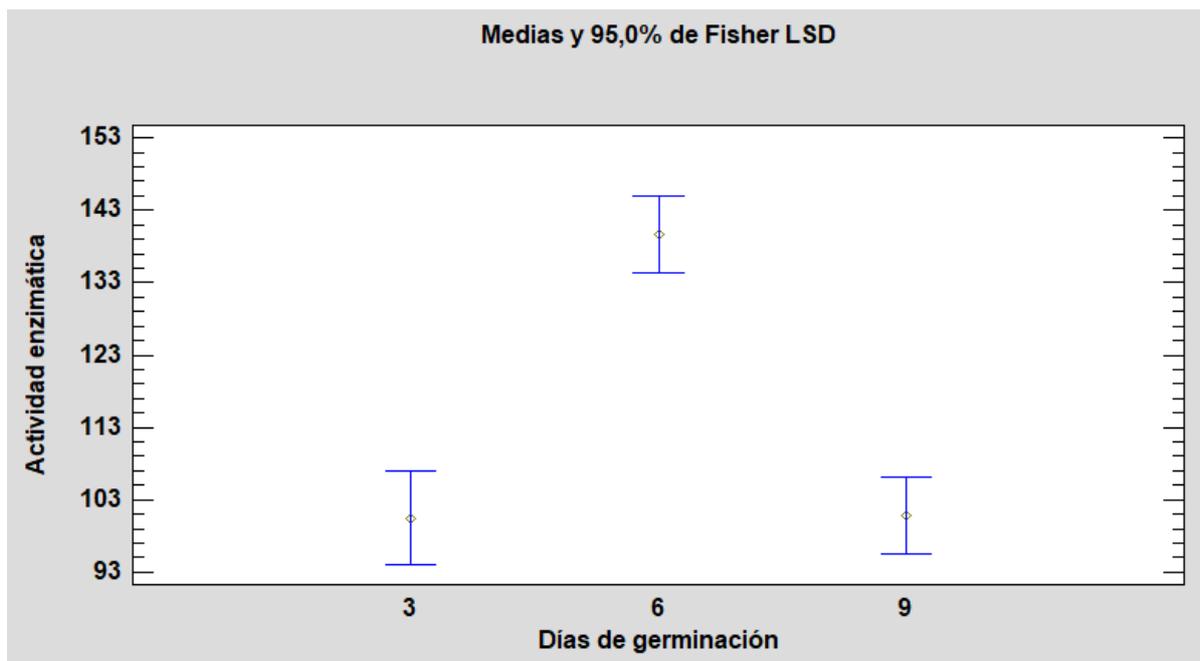


Figura Suplementaria 2 (S2). Gráfica de medias de la actividad enzimática específica (mU/mg proteína) según los días de germinación de la lenteja.

Tabla Suplementaria 1 (S1). Análisis de la Varianza multifactorial para la actividad enzimática específica con los factores temperatura y pH de reacción.

	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Valor-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura	20491,9	1	20491,9	199,59	0,0000
B: pH	77767,5	3	25922,5	252,48	0,0000
INTERACCIONES					
AB	14775,8	3	4925,26	47,27	0,0000
RESIDUOS	6570,96	64	102,671		
TOTAL (CORREGIDO)	119606	71			

Tabla Suplementaria 2 (S2). Análisis de la Varianza para la actividad enzimática específica de extractos de guisante germinado durante seis días, tras la aplicación de PEF con diferentes combinaciones de voltajes (V) y n° de pulsos.

	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Valor-F	P-Valor
A: Voltaje	805,83	1	805,83	0,23	0,6662
B: Num. pulsos	16231,1	1	16231,1	4,58	0,1219
AA	8804,55	1	8804,55	2,48	0,2132
AB	18505,2	1	18505,2	5,22	0,1065
BB	6655,6	1	6655,6	18,77	0,0227
Error total	10639,1	3	3546,37		
Total (corr.)	121540	8			

Tabla Suplementaria 3 (S3). Análisis de la Varianza para la actividad enzimática específica de extractos de lenteja germinado durante seis días, tras la aplicación de PEF con diferentes combinaciones de voltajes (V) y n° de pulsos.

	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Valor-F	P-Valor
A: Voltaje	43936,6	1	43936,6	5,77	0,0958
B: Num. pulsos	14762,4	1	14762,4	1,94	0,2582
AA	9053,61	1	9053,61	1,19	0,3554
AB	2288,09	1	2288,09	0,30	0,6218
BB	54,0487	1	54,0487	0,01	0,9382
Error total	22856,2	3	7618,72		
Total (corr.)	92950,9	8			