



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Obtención de diamino oxidasa a partir de legumbres
germinadas y pretratadas con PEF

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: García Abril, Paula

Tutor/a: Benedito Fort, José Javier

Cotutor/a: Cárcel Carrión, Juan Andrés

Director/a Experimental: SANCHEZ JIMENEZ, VIRGINIA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

OBTENCIÓN DE DIAMINO OXIDASA A PARTIR DE LEGUMBRES GERMINADAS Y PRETRATADAS CON PEF

Paula García Abril, José Javier Benedito Fort y Juan Andrés Cárcel Carrión¹

RESUMEN

La intolerancia a la histamina es un trastorno relacionado con el déficit de enzima DAO a nivel intestinal. La suplementación oral o dietas restrictivas son las soluciones actuales. Se están estudiando nuevas estrategias, como la obtención de DAO de fuentes vegetales y su aplicación directa en alimentos para reducir el contenido de histamina. La investigación se enfoca en tecnologías como los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF), para mejorar el rendimiento de DAO durante la germinación. Esto podría aumentar la actividad de la misma, brindando una alternativa más atractiva y eficaz para tratar esta intolerancia.

El objetivo de este trabajo fue obtener enzima DAO a partir de guisantes y garrofón durante su germinación tras el pretratamiento con tecnología PEF.

Se observó que tanto la longitud del germen como el contenido proteico aumentaron con el tiempo de germinación en ambas semillas. La actividad enzimática de DAO alcanzó su máximo entre 3 y 6 días de germinación, disminuyendo después. El pH del agua de remojo influyó en la cantidad de DAO formada. Además, se evaluó el efecto de los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF) como pretratamiento antes de la germinación. Se encontraron resultados variables en la germinación, contenido proteico y actividad enzimática. Las semillas de guisante mostraron un mayor contenido proteico y actividad enzimática en comparación con las de garrofón. Sin embargo, comparando las muestras control con las tratadas con PEF, en estas últimas se obtuvo un contenido proteico y actividad enzimática menor en el caso de los guisantes, y no se encontraron diferencias significativas en el caso del garrofón.

RESUM

La intolerància a la histamina és un trastorn relacionat amb el dèficit de l'enzim DAO a nivell intestinal. La suplementació oral o dietes restrictives són les solucions actuals. S'estan investigant noves estratègies, com l'obtenció de DAO de fonts vegetals i la seua aplicació directa en aliments per a reduir el contingut de histamina. La investigació es centra en tecnologies com els polsos elèctrics d'alta intensitat (PEF), per a millorar el rendiment de DAO durant la germinació. Això podria augmentar l'activitat de DAO, proporcionant una alternativa més atractiva i eficaç per a tractar aquesta intolerància.

¹Universitat Politècnica de València Camino de Vera.

L'objectiu d'aquest treball va ser obtenir l'enzim DAO a partir de pèsols i garrofó durant la seua germinació després del pretractament amb tecnologia PEF.

Es va observar que tant la longitud del brot com el contingut proteic van augmentar amb el temps de germinació en ambdues llavors. L'activitat enzimàtica de DAO va assolir el seu màxim entre 3 i 6 dies de germinació, disminuint després. El pH de l'aigua de remull va influir en la quantitat de DAO formada. A més, es va avaluar l'efecte dels polsos elèctrics d'alta intensitat (PEF) com a pretractament abans de la germinació. Es van trobar resultats variables en la germinació, contingut proteic i activitat enzimàtica. Les llavors de pèsol van mostrar un major contingut proteic i activitat enzimàtica en comparació amb les de garrofó. No obstant això, comparant les mostres control amb les tractades amb PEF, en aquestes últimes es va obtenir un contingut proteic i activitat enzimàtica menor en el cas dels pèsols, i no es van trobar diferències significatives en el cas del garrofó.

ABSTRACT

Histamine intolerance is a disorder related to a deficiency of the DAO enzyme at the intestinal level. Current solutions include oral supplementation or restrictive diets. New strategies are being investigated, such as obtaining DAO from plant sources and incorporating it into foods to reduce histamine levels. Research is focused on technologies like high-intensity pulsed electric fields (PEF) to enhance DAO yield during germination. This could increase DAO activity, offering a more appealing and effective alternative for treating this intolerance.

The objective of this study was to obtain the DAO enzyme from peas and fava beans during their germination following pre-treatment with PEF technology.

It was observed that both the sprout length and protein content increased with germination time in both seeds. DAO enzymatic activity reached its peak between 3 and 6 days of germination, and then decreased. The pH of the soaking water influenced the amount of formed DAO. Furthermore, the effect of high-intensity pulsed electric fields (PEF) as a pre-treatment before germination was evaluated. Variable results were obtained in germination, protein content, and enzymatic activity after PEF treatments. Pea seeds exhibited higher protein content and enzymatic activity compared to fava beans. However, when comparing the control samples with the PEF treated ones, the treated pea samples showed lower protein content and enzymatic activity, while no significant differences were found in the case of fava beans.

Palabras clave: germinación, DAO, guisante, garrofón, actividad enzimática, PEF.

1. INTRODUCCIÓN

Las aminas biogénicas, especialmente la histamina, se encuentran en diferentes concentraciones en gran variedad de alimentos como el pescado, el queso o el vino (San Mauro Martin et al., 2016). La intolerancia a la histamina es un trastorno relacionado con la dieta que ha ganado atención en las últimas dos décadas (Comas-Basté et al., 2020a) y se debe a su deficiente degradación a nivel intestinal (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHARZ), 2011). La deficiencia de la enzima diamino oxidasa (DAO), encargada de degradar la histamina ingerida, se ha propuesto como su causa principal. Esta intolerancia tiene una prevalencia del 1-3% y representa la tercera causa de intolerancia alimentaria después de la de la lactosa y la del gluten. Entre los síntomas que produce se encuentran problemas gastrointestinales y extra-gastrointestinales, siendo la migraña el más representativo (Comas-Basté et al., 2020a). Se están explorando enfoques dietéticos para tratarla, como la exclusión del consumo de alimentos con altos niveles de histamina (Maintz & Novak, 2007). Sin embargo, la amplia y variable presencia de histamina en los alimentos lleva a proponer dietas excesivamente restrictivas (San Mauro Martin et al., 2016).

Por otro lado, la suplementación oral de DAO es otra alternativa de tratamiento, ya que mejora la capacidad del intestino para degradarla. Sin embargo, la mayoría de los consumidores siente rechazo hacia esta opción. Además, la suplementación con DAO debe adaptarse individualmente según los niveles de intolerancia y el tipo de alimento consumido (Comas-Basté et al., 2019b). Por ello, se están investigando otras opciones, como la posibilidad de reducir la formación de histamina en los alimentos o agregar DAO a los mismos para eliminarla antes de su ingesta. Los extractos proteicos de riñón de cerdo se utilizan actualmente como fuente de DAO en suplementos nutricionales aprobados por la Comisión Europea (UE 2018/1023). Además, se están estudiando otras fuentes vegetales de DAO, como los brotes de guisantes (Comas-Basté et al., 2020b).

1.1 Histamina en alimentos

La histamina se forma en los alimentos a causa de la actividad de enzimas microbianas sobre aminoácidos específicos. Su presencia y concentración puede variar y depende de factores como el tipo de alimento, los microorganismos presentes y las condiciones favorables para la actividad enzimática (San Mauro Martin et al., 2016).

Las reacciones de descarboxilación producidas tanto por cepas bacterianas Gram-positivas como Gram-negativas, pueden dar lugar a la formación de histamina. En particular, se han identificado especies de Enterobacteriaceae, como *Hafnia alvei*, *Morganella morganii* y *Klebsiella pneumoniae*, como algunas de las más prolíficas en la producción de histamina en pescado. En productos fermentados como los quesos, carnes, derivados vegetales y bebidas se han identificado diversas bacterias lácticas, como *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus curvatus* y *Oenococcus oeni*, y

también algunas cepas de Enterobacteriaceae. De hecho, los alimentos que pueden contener niveles elevados de histamina son aquellos que han experimentado alteraciones microbiológicas o productos que han sido conservados o procesados en condiciones higiénicas inadecuadas (Comas-Basté et al., 2020a).

1.2 Enzima diamino oxidasa (DAO)

La DAO es una enzima homodimérica que se encuentra ampliamente distribuida en diferentes tejidos y organismos (Comas-Basté et al., 2019a). Cataliza la desaminación oxidativa del grupo amino primario (NH₂) de la histamina, transformándolo en imidazol acetaldehído. Durante esta reacción, la DAO consume oxígeno, y como resultado, se libera amoníaco y peróxido de hidrógeno (Comas-Basté et al., 2019a).

La DAO y la histamina-N-metiltransferasa (HNMT) son las dos enzimas encargadas de la eliminación de histamina en los seres humanos (Comas-Basté et al., 2020b). La DAO se secreta principalmente en células epiteliales tubulares proximales renales e intestinales, por lo que su acción es clave para la degradación de histamina ingerida proveniente de los alimentos. Un déficit en la acción o secreción de esta enzima conlleva niveles plasmáticos de histamina superiores a los normales (0,3-1,0 ng/mL) y, como consecuencia, el desarrollo de una intolerancia con síntomas diversos (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHARZ), 2011). La actividad deficiente de la DAO puede tener un origen genético o adquirido (Comas-Basté et al., 2020a).

El porcentaje de población intolerante a la histamina exógena está creciendo, por lo que muchos estudios se están centrando en la búsqueda de fuentes de DAO para la elaboración de suplementos o para incluir la DAO directamente en los alimentos (Comas-Basté et al., 2020b; Comas-Basté et al., 2019a; Mantilla et al., 2002).

1.2.1 FUENTES DE DAO

En el año 2018, la Comisión Europea (EU 2018/1023) aprobó la comercialización de suplementos elaborados a partir de extractos de proteína de cerdo. Estos suplementos se producen a partir de subproductos de empresas cárnicas, como son el hígado y los riñones. Otras fuentes para la obtención de DAO son las de tipo vegetal, principalmente leguminosas como guisantes, garbanzos o lentejas (Comas-Basté et al., 2020b; Comas-Basté et al., 2019a; Mantilla et al., 2002). En estos casos, la DAO se genera durante el proceso de germinación. Así, el H₂O₂ generado por la acción de la DAO, junto con la acción de las catalasas, se utiliza para la síntesis de las paredes celulares, la lignificación, la movilización de reservas de las semillas y en respuesta a ataques de patógenos. Por lo tanto, las condiciones en las que transcurre la germinación podrían influir en el nivel de DAO generado (Comas-Basté et al., 2020b).

Mantilla et al. (2002) observaron que la máxima actividad de DAO en garbanzos se encontró en el eje embrionario de las plántulas cultivadas

durante 72h (0,42 U/mg de proteína). Por otra parte, Comas-Basté et al. (2020b), observaron que tanto el nivel de iluminación durante la germinación, como el tiempo de germinación, tienen un papel importante en la producción y actividad de la DAO. Estos autores determinaron que hacer crecer la plántula en estado de etiolación (oscuridad) y durante 6 d, proporcionaron una mayor actividad de DAO ($4,08 \cdot 10^{-4}$ U/mg de muestra). La actividad de la enzima disminuyó a partir de los 6 d de germinación. Amirjani (2010), expusieron a plantas de soja a diferentes concentraciones de NaCl (200mM máx.) obteniendo como resultado un aumento en la actividad de la DAO en respuesta al estrés salino ($3,5 \cdot 10^{-4}$ U/mg de proteína). Por lo tanto, tratamientos que generan estrés durante la etapa de germinación, como la aplicación de PEF, podrían aumentar el rendimiento y/o la actividad de DAO (Ahmed et al., 2020).

Así pues, las fuentes vegetales podrían ofrecer una alternativa más sostenible y con una actividad enzimática superior a los productos cárnicos (Comas-Basté et al., 2019a). Sin embargo, la actividad de la DAO varía considerablemente entre distintas leguminosas (Comas-Basté et al., 2020b), por lo que es interesante determinar cuáles de ellas tienen un mayor potencial.

1.3 Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF)

La tecnología PEF consiste en la aplicación de pulsos eléctricos de corta duración (microsegundos) y alta intensidad a un producto (Maza et al., 2017). La intensidad del campo eléctrico aplicado viene determinada por la diferencia de potencial y la distancia entre los electrodos (Ecuación 1).

$$E = \frac{V}{d} \quad (1)$$

donde E es la intensidad de campo eléctrico (kV/cm), V es el voltaje (kV) y d, la distancia entre los electrodos (cm).

Según Maza et al. (2017), la membrana celular posee un potencial de membrana específico, lo que implica una diferencia de carga entre el interior y el exterior de la célula debido a la variación en la concentración de iones. Este potencial de membrana puede ser modificado al exponer la célula a un campo eléctrico externo. En consecuencia, cuando la intensidad del campo eléctrico excede un umbral determinado, se produce la formación de poros hidrofílicos por la reorientación de los lípidos de membrana, fenómeno llamado electroporación, que supone un aumento en la permeabilidad de las células (López, 2017).

La intensidad de campo eléctrico requerida para aumentar la permeabilidad de la membrana es conocido como intensidad de campo eléctrico crítico (Vivanco et al., 2021). Existen dos tipos de electroporación, reversible e irreversible. La primera ocurre cuando los poros que se forman son pequeños e inestables. Después del tratamiento, la célula puede regenerar la membrana y recuperar su viabilidad. La electroporación irreversible se produce cuando la intensidad del campo aplicado es lo suficientemente alta como para crear poros más grandes y estables en la membrana. En este caso, la célula no puede reparar el daño causado y

finalmente muere (Martín & Raso, 2018). Así, la aplicación de PEF se está utilizando como tratamiento no-térmico para conseguir alimentos seguros y con una mayor calidad organoléptica. En este campo, se ha estudiado su aplicación en alimentos líquidos, como la leche (Walter et al., 2016), emulsiones de aceite en agua (Gómez-Gómez et al., 2021) o zumo de naranja (Walkling-Ribeiro et al., 2009), entre otros.

Esta técnica también ha sido empleada como pretratamiento para facilitar otros procesos, como la extracción de compuestos como flavonoides y antioxidantes de matrices vegetales empleadas para la elaboración de alimentos como el vino tinto (Puértolas et al., 2010) o los zumos de fruta (Jemai & Vorobiev, 2006). En la deshidratación o secado de alimentos, el pretratamiento con PEF reduce la resistencia a la difusión del agua a nivel celular, acelerando la pérdida de agua y disminuyendo los tiempos de secado (Ostermeier et al., 2020). En cuanto a la congelación, la aplicación de PEF aumenta la tolerancia de las células a la formación de cristales de hielo (Nowosad et al., 2021).

Por otro lado, la aplicación de PEF sobre semillas puede generar estrés en las células por el aumento de la permeabilidad de la membrana, afectando directamente a reacciones bioquímicas y fisiológicas durante el desarrollo de la plántula. De esta forma, se ve alterado el metabolismo normal de las células y la producción de componentes metabólicos (Ahmed et al., 2020). El efecto del tratamiento PEF sobre la germinación depende del estado fisiológico de la semilla y la intensidad del campo eléctrico aplicado durante el tratamiento (Ahmed et al., 2020).

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es obtener enzima DAO a partir de fuentes vegetales durante su germinación.

Para lograr el objetivo general del proyecto, se consideraron los siguientes objetivos particulares:

- Determinar el efecto de diferentes condiciones de germinación en la producción y actividad de DAO.
- Determinar la influencia de la aplicación de la tecnología PEF en el rendimiento y la actividad de la DAO durante la germinación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL

En este estudio se trabajó con semillas de guisante y garrofón. En ambas se siguió una secuencia de trabajo similar. Antes del proceso de germinación, las semillas se sometieron a un periodo de remojo para su hidratación durante 12 h. Se realizaron una serie pruebas preliminares para determinar las mejores condiciones de germinación de ambas semillas variando el pH del agua de remojo y los días de germinación. Una vez establecidas las condiciones más adecuadas, se realizaron diferentes series

experimentales de tratamiento de las semillas con pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) tras el periodo de remojo, intentando garantizar el crecimiento de las semillas.

En el caso del garrofón, se presentaron problemas con el desarrollo de moho durante la germinación. Por eso, se ensayaron diferentes tratamientos con diluciones de lejía previos al proceso de remojo. Incluso se llegó a ensayar la aplicación de una dilución de lejía tras el tratamiento PEF.

Una vez hidratadas, tanto las semillas tratadas con PEF como las no tratadas, se colocaron en recipientes de vidrio ventilados, junto con una solución salina para controlar la humedad relativa (75%). Los recipientes se introdujeron en una estufa a 27 °C y se dejaron germinar a diferentes tiempos. Todas las condiciones ensayadas se realizaron por triplicado.

Después de la germinación, las semillas se envasaron al vacío y se congelaron. A continuación, se liofilizaron para eliminar el agua. Posteriormente, se extrajo la DAO y se analizó su actividad enzimática. Adicionalmente, se determinó la cantidad de proteína presente en las muestras, con el fin de relacionar la actividad enzimática con el contenido proteico. Por último, se realizó un análisis estadístico utilizando todos los datos obtenidos para determinar el efecto del pH del agua de remojo y los diferentes tratamientos con PEF sobre la actividad enzimática de la DAO.

A continuación, se describe en detalle las condiciones ensayadas en cada una de estas etapas.

3.2 MATERIA PRIMA

En este estudio se emplearon semillas de guisante de la variedad *Pisum sativum*, proporcionadas por el departamento de Ciencia Animal de la UPV, y semillas de garrofón “pintat” de la variedad *Phaseolus lunatus L.*, adquiridas en Frutos Secos Conchín, mercado de Ruzafa, Valencia.

3.2.1 ETAPA DE REMOJO

La etapa de remojo fue ligeramente diferente en el caso de las semillas de garrofón que en las de guisante. Así, se tomaron 30 g de garrofón y se pusieron a remojo durante 5 min en una dilución de lejía al 3% para evitar el posterior desarrollo de moho. A continuación, el garrofón desinfectado se colocó en un recipiente de vidrio con 200 mL de agua destilada durante un periodo de 12 h. En el caso de los guisantes, no se aplicó el tratamiento con lejía y 40 g de semillas se pusieron directamente en 200 mL de agua destilada durante 12 h.

Para estudiar la influencia del pH del agua de remojo, se ajustó el pH de esta a 3, 5 y 7 con NaOH, HCl y un pHmetro (pH 50 Violab Benchtop pHmeter – 201T DHS Electrode, XS instruments, Italy). El remojo control se realizó con agua destilada (pH 6,5).

Por otro lado, otro lote de las semillas, destinadas a recibir los pretatamientos con PEF, se remojaron directamente en agua destilada.

3.2.2 TRATAMIENTO CON PEF

3.2.3 EQUIPO DE PEF

El equipo PEF consiste en un generador de pulsos eléctricos (EPULSUS-PM1-10; Energy Pulse Systems, Lda, Lisboa, Portugal) y una celda de tratamiento con dos electrodos separados una distancia de 10 cm. La celda se sitúa dentro de una cabina de protección. Las semillas se colocaron en la celda entre los electrodos y se cubrieron con 150 ml de agua del grifo.

3.2.4 CONDICIONES DE TRATAMIENTO

En primer lugar, se realizaron tres series de experiencias para determinar la intensidad del tratamiento de PEF que permitiera un buen desarrollo de las semillas. En todos los casos, se aplicó un ancho de pulso de 10 μ S y una frecuencia de 10 Hz. En la primera serie, se ensayaron tratamientos con una intensidad de campo de 1 kV/cm y 100, 55 y 10 pulsos. Después, en una segunda serie, se aplicaron tratamientos con una intensidad de campo de 1 kV/cm y 40, 25 y 10 pulsos. En esta segunda serie experimental también se testeó la influencia del remojo de las semillas en una dilución de lejía al 3% durante 5 min después de los tratamientos de PEF para evitar el crecimiento de moho durante la germinación. Por último, en una nueva serie, se ensayaron otros dos tratamientos, utilizando una intensidad de campo de 0,65 kV/cm y 30 y 10 pulsos. Todos los tratamientos se aplicaron por triplicado y de igual forma a las semillas de guisante y de garrofón.

3.3 Germinación de las semillas

Después de la fase de remojo, las semillas, tratadas o no con PEF, se introdujeron entre dos papeles de filtro humedecidos en recipientes de cristal con ventilación. Para mantener una adecuada humedad relativa (75%), se introdujo también otro recipiente más pequeño con una disolución saturada de cloruro sódico. Después, los recipientes se colocaron en una cámara termostregulada (Binder serie KMF, Fisher Scientific; Madrid, España) a 27 °C y en oscuridad, durante un período de tiempo determinado (3, 6 y 9 d para las semillas sin tratamiento PEF y 6 d para las tratadas). Cada germinación se llevó a cabo por triplicado. A cada tiempo ensayado, se extrajeron las semillas y se midió la longitud del brote. Después, las semillas se congelaron (-28 °C) y se liofilizaron (Lyomicron, Coolvacuum; Barcelona, España). Posteriormente, las muestras se trituraron con un molinillo doméstico durante 30 s. El polvo obtenido se tamizó (luz de 1 mm), se envasó a vacío y se mantuvo congelado (-28 °C) en oscuridad hasta su análisis.

3.4 Extracción enzimática

La extracción de la DAO se realizó en un tampón fosfato con glicerol tomando como referencia el procedimiento llevado a cabo por Yang et al. (2012). Para ello, en un tubo de 50 mL se mezclaron 4 g de muestra y 12 mL

del tampón de glicerol, previamente preparado, en un vortex y se puso en agitación en un baño a 4 °C durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min a 4 °C (Centrífuga Digicen 21 R, Ortoalresa; Madrid, España). El sobrenadante se pasó a un matraz aforado de 50 mL. Esto se repitió 3 veces, obteniéndose 3 sobrenadantes que se juntaron en el matraz. A continuación, se aforó el matraz con el tampón de glicerol. Del contenido del matraz se extrajeron 3 alícuotas de 1 mL en tres eppendorfs. El resto se almacenó en un tubo de Falcon. Tanto los eppendorfs como el tubo Falcon se congelaron a -28 °C para su posterior análisis.

3.5 Análisis de la actividad enzimática

El análisis de la actividad enzimática se llevó a cabo según el protocolo descrito por Kettner et al. (2020) que diferencia entre el peróxido de hidrógeno que proviene de la germinación de las semillas y el H₂O₂ formado en la reacción catalizada por la DAO. Por ello, y como referencia, se hicieron análisis de las muestras sin adición de histamina. De esta forma, sólo se determina el H₂O₂ ya presente en el extracto de la muestra.

En los eppendorfs se añadieron 750 µL de disolución de histamina (en los de referencia se añadieron 750 µL de tampón ácido 1,4-piperazina etanosulfónico o PIPES). A continuación, se agregaron 726 µL de DA-67 (disolución de sal sódica de 10-carboximetil-aminocarbonil-3,7-bis(dimetilamino) fenotiazina). La mezcla se agitó en un vortex y se colocaron en un baño a 37°C durante 10 min. Después, se añadieron 24 µL de peroxidasa (POD), que actúa sobre el H₂O₂ formado durante la reacción, y 50 µL de germinado, se volvió a agitar en el vortex y se mantuvo en un baño a 37 °C durante otros 10 min, siendo éste el tiempo de reacción enzimática. Posteriormente, se añadieron 50 µL de dietilditiocarbamato de sodio para detener la reacción enzimática (volumen final en cada eppendorf de 1,6 mL). Los eppendorfs se centrifugaron a 10000 rpm durante 3 min a 20°C. Finalmente, se midió la absorbancia de cada muestra y su referencia a 668 nm (EZ Read 2000; Biochrom, Reino Unido).

Previamente, se prepararon sendas rectas patrón para el guisante y el garrofón con diluciones de H₂O₂ de concentración conocida. Los valores de absorbancia de las muestras se compararon con los de recta patrón y así se calculó el contenido en peróxido de hidrógeno. La actividad enzimática se expresó en nmol de histamina/min·0,05 ml extracto (U/0,05 ml extracto).

3.6 Determinación del contenido de proteínas

El contenido proteico de las muestras se determinó con el método de Bradford (Kruger, 2009). Así, el reactivo Bradford se preparó y se almacenó en una botella ámbar a temperatura ambiente. Por otro lado, se elaboró una recta patrón con diferentes concentraciones conocidas (100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL) de albúmina sérica bovina (BSA) en tampón fosfato glicerol.

Para las determinaciones, se mezcló 0,1 mL de las disoluciones de BSA o de las muestras diluidas en proporción 1/100 con 5 mL de reactivo Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm. Como blanco se utilizó 0,1 mL de tampón fosfato glicerol junto con el reactivo Bradford. El contenido proteico (mg/0,05 mL extracto) presente en los extractos se determinó por comparación con la recta de calibrado.

A partir del cociente de la actividad enzimática (U/0,05 ml extracto) y del contenido proteico se calculó la actividad enzimática específica, que expresa la actividad enzimática por mg de proteína. Esto permitió la comparación de los resultados con los obtenidos por otros autores (apartado 1.2.1).

3.7 Estudio de la variabilidad de germinación

Por otra parte, se realizó un estudio con guisantes para evaluar la variabilidad del proceso de germinación entre distintos lotes. Para ello, se determinó la actividad enzimática (U/0,05 ml extracto) y el contenido proteico por triplicado en muestras germinadas en lotes/días diferentes.

3.8 Análisis estadístico

La significación de las diferencias de los resultados se estudió mediante un ANOVA multifactorial en el caso del efecto del pH y los días de germinación, y un ANOVA simple, para el efecto del tratamiento con PEF (StatGraphics Centurion XVII, Statgraphics Technologies, Inc., Virginia, USA) a un nivel de confianza del 95%. Para discriminar entre las medias de los factores, se determinó la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de la variabilidad de la germinación

El estudio de variabilidad de germinación realizado con guisantes mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) tanto en el contenido proteico como en la actividad enzimática entre las muestras germinadas en días distintos. Esto implica que pequeños cambios en las condiciones de germinación pueden influir significativamente en la síntesis de proteínas y en la actividad y regulación de las enzimas durante el proceso de germinación. Por eso, resulta interesante conocer la influencia de las principales variables de proceso.

4.2 Efecto de las condiciones de germinación

4.2.1 DESARROLLO DE LAS SEMILLAS

4.1.1.1 Guisantes

En primer lugar, se estudió la influencia del tiempo de germinación y el pH del medio de remojo en la tasa de germinación y el crecimiento del germen.

Así, como cabía esperar, conforme aumentó el tiempo de germinación se observó una mayor longitud del germen (Figura 1) para todos los pHs ensayados, siendo significativas ($p < 0,05$) las diferencias entre los tres tiempos de germinación considerados. Sin embargo, no se encontró un efecto significativo ($p > 0,05$) del pH del agua de remojo en la longitud del germen (Figura 1).

Respecto a la tasa de germinación (Figura 1), en las experiencias control (remojo con agua destilada pH 6,5), la tasa, cercana al 100%, fue similar entre los diferentes días de germinación ensayados. Esto indica que la germinación se produjo en su totalidad antes del primer tiempo considerado, 3 d. En cuanto a la influencia del pH del agua de remojo, las muestras tratadas a pH 3 mostraron una ralentización significativa ($p < 0,05$) en la tasa de germinación (Figura 1). Así el máximo valor se alcanzó a los 9 d y fue ligeramente inferior al del control. La tasa de germinación a los demás pHs ensayados no resultó significativamente diferente ($p > 0,05$) que la de las experiencias control.

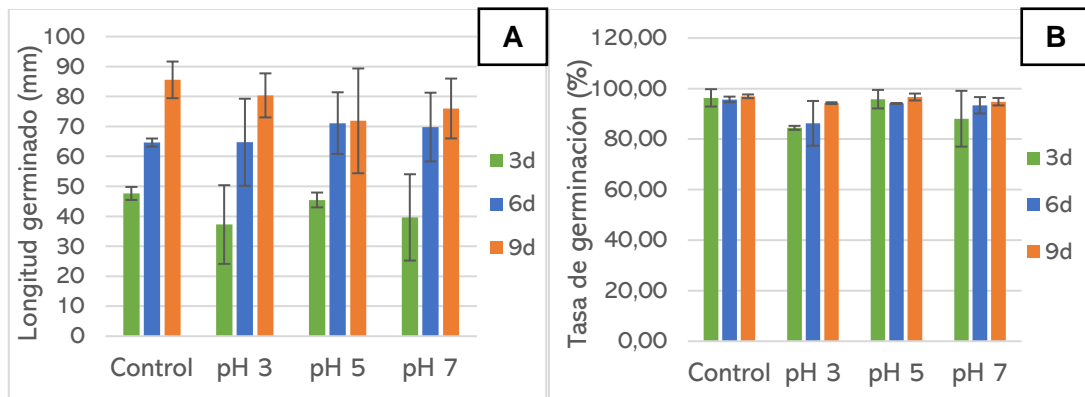


FIGURA 1. Evolución de la longitud del germen (A) y tasa de germinación (B) de semillas de guisante durante la germinación con remojo previo de las semillas a distintos pHs.

4.1.1.2 Garrofón

En el caso del garrofón, también se observó un aumento de la longitud del germen con el tiempo de germinación (Figura 2). En este caso, las diferencias significativas ($p < 0,05$) se encontraron únicamente entre 3 d (40 mm) y 6-9 d (54 mm) de germinación. Cabe destacar que la variabilidad fue mayor que en el caso de los guisantes. Por otra parte, al igual que para el guisante, no se encontró un efecto significativo ($p > 0,05$) del pH del agua de remojo.

En relación con la tasa de germinación (Figura 2), en las muestras control no se encontraron diferencias entre los días de germinación. Esto indica, como en el guisante, que la germinación sucedió antes de los 3 d. En lo que respecta a la influencia del pH de remojo, el pH 3 fue el que mayor tasa de germinación presentó, alcanzando el 100% en los tres casos (Figura 2). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de germinación entre los pHs ensayados ($p > 0,05$).

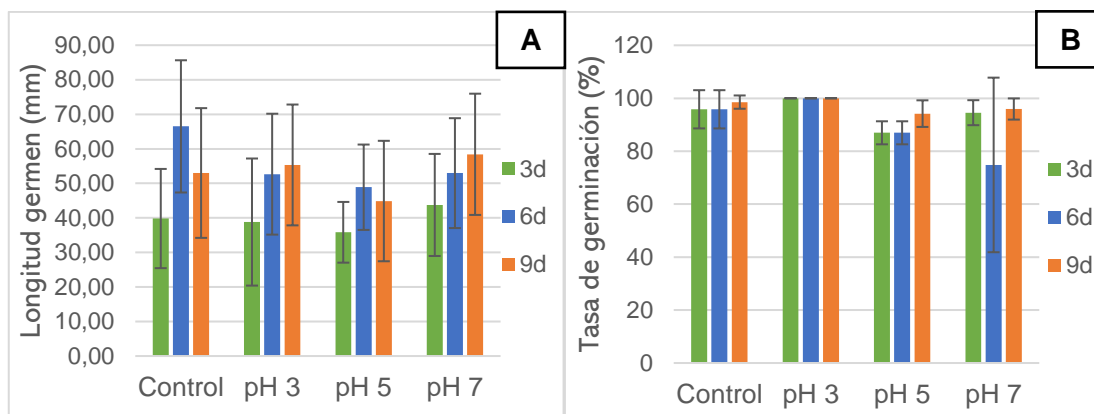


FIGURA 2. Evolución de la longitud del germen (A) y tasa de germinación (B) de semillas de garrofón durante la germinación con remojo previo de las semillas a distintos pHs.

No se ha podido encontrar ningún estudio sobre la influencia de los días de germinación y pH del agua de remojo sobre la longitud del germen y la tasa de germinación tanto en el caso de los guisantes como en el del garrofón.

4.1.2 CONTENIDO PROTEICO

4.1.2.1 Guisantes

También se estudió la influencia del tiempo de germinación y el pH del medio de remojo en el contenido proteico de las semillas. Así, se observó un incremento del contenido proteico con el tiempo de germinación (Figura 3). Las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$) entre los 3-6 d y los 9 d. Por otro lado, se obtuvieron ligeras diferencias entre los distintos pHs (Figura 3) pero éstas no resultaron significativas ($p > 0,05$). El máximo contenido en proteína se obtuvo en las semillas germinadas durante 9 d y con un pH de remojo de 7 (18,38%). Comas-Basté et al., (2019a) obtuvieron un 39% de contenido proteico en los guisantes liofilizados, siendo un valor mucho más elevado. En mayoría de los casos, se puede apreciar una importante variabilidad (Figura 3). La germinación de las distintas réplicas se llevó a cabo en lotes/días diferentes y, como se ha mostrado en el estudio de variabilidad, esto pudo afectar al desarrollo de las semillas, lo que se reflejó en la variabilidad del contenido proteico.

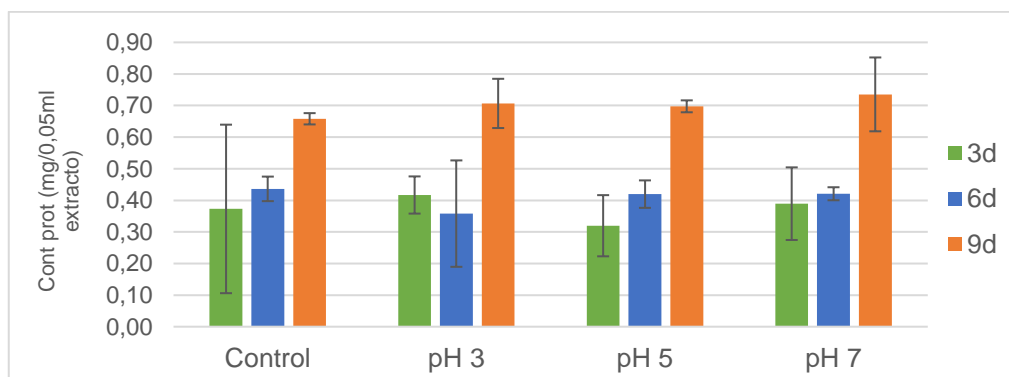


FIGURA 3. Evolución del contenido proteico de semillas de guisante durante la germinación con remojo previo de las semillas a distintos pHs.

4.1.2.2 Garrofón

Al contrario que con los guisantes, en el caso del garrofón no se observó una evolución clara del contenido proteico durante el tiempo de germinación (Figura 4). Así, en las muestras control, el contenido a los 3 d (0,243 mg/0,05 ml extracto) fue significativamente mayor que a los 9 d, al igual que a pH 3. Sin embargo, estas diferencias no se observaron a pHs 5 y 7. Aquí también se pudo apreciar una gran variabilidad entre las réplicas, debiéndose probablemente también a las variaciones en las condiciones de germinación.

Comparando el contenido proteico del garrofón con el de los guisantes, se observó que el de los guisantes prácticamente dobló al del garrofón. Esto se debe a que son distintas legumbres con distinta composición.

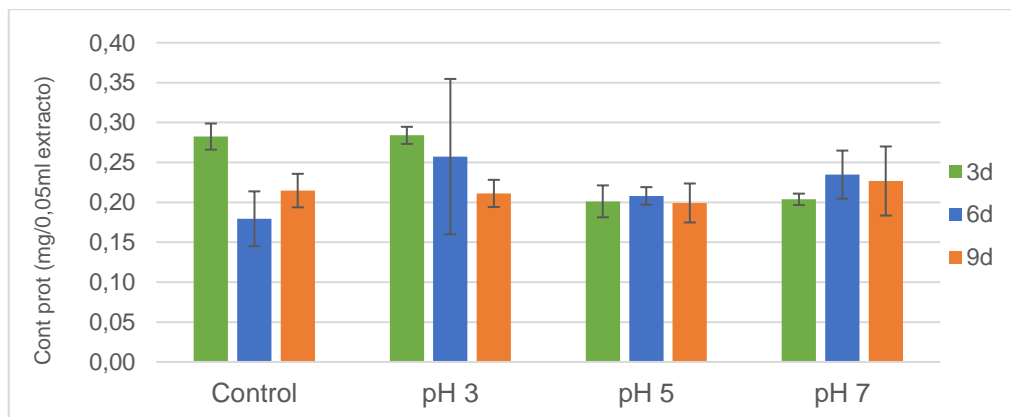


FIGURA 4. Evolución del contenido proteico de semillas de garrofón durante la germinación con remojo previo de las semillas a distintos pHs.

En este estudio el máximo contenido en proteína se obtuvo en semillas germinadas durante 3 d y con un pH de remojo de 3 (4,49%). Torruco-Uco et al., (2009) obtuvieron un contenido proteico en el garrofón 28%, siendo un valor mucho más elevado.

4.1.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

4.1.3.1 Guisantes

La media de la actividad enzimática fue de 0,365 U/0,05 ml extracto a los 3 d de germinación, experimentando un ligero, pero no significativo ($p > 0,05$) aumento (0,385 U/0,05 ml extracto) a los 6 d y disminuyendo significativamente ($p < 0,05$) a los 9d (0,19 U/0,05 ml extracto) (Figura 5). Por lo tanto, el tiempo óptimo para obtener la máxima actividad de DAO de los germinados sería alrededor de los 6 d.

El pH del agua de remojo presentó un efecto casi inexistente en la actividad enzimática. Únicamente, se observó que a pH 5 y 7, se mantuvo ligeramente mejor la actividad enzimática hasta el día 9 (Figura 5).

De estos resultados se puede concluir que la actividad enzimática más elevada se obtuvo en las semillas control germinadas durante 6 d ($0,42 \pm 0,10$ U/0,05 ml extracto).

La actividad enzimática específica alcanzó el máximo a los 3 d de germinación, disminuyendo significativamente ($p < 0,05$) a partir de ese momento (Figura 5). A medida que avanzó la germinación, aumentó el contenido proteico, pero la actividad de la enzima DAO no siguió la misma tendencia, lo que hizo disminuir la actividad específica. Es lógico que la enzima DAO presente un máximo de actividad al inicio de la germinación, ya que se necesita en diferentes rutas metabólicas de esa etapa (Comas-Basté et al., 2020b). La media de la actividad específica en el pH 5 ($0,88$ U/mg) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que para el resto de pHs. De nuevo, la gran variabilidad existente podría deberse a las diferencias naturales que existen entre las semillas y a las posibles variaciones de las condiciones de germinación, al haberse realizado en días distintos.

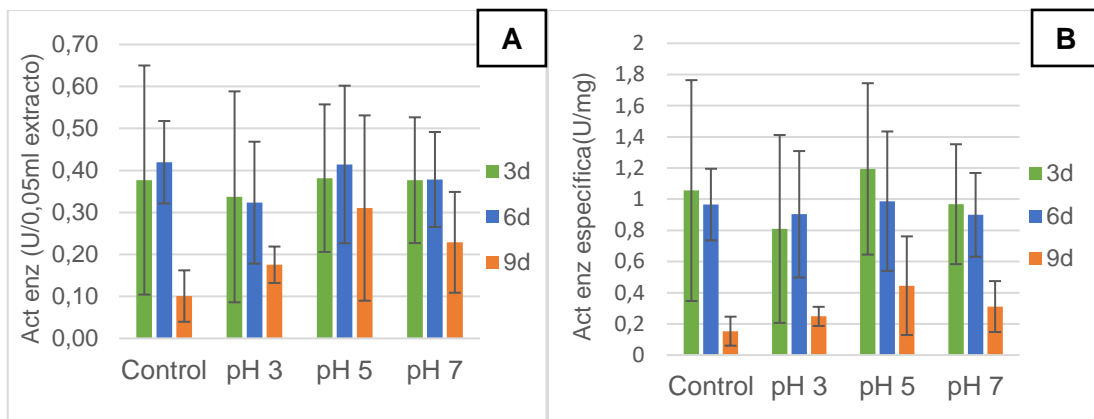


FIGURA 5. Evolución de la actividad enzimática (A) y actividad enzimática específica (B) de semillas de guisante durante la germinación con remojo previo de las semillas a distintos pHs.

Autores como Mantilla et al. (2002) han observado que la máxima actividad enzimática tras la germinación se encuentra en distintas partes del germen. Sin embargo, en este caso no se encontró ninguna relación significativa ($p > 0,05$) entre la longitud del germinado y la actividad enzimática.

Comas-Basté et al. (2020b), representaron la actividad de la DAO por mg de muestra, obteniendo el máximo valor tras 6 d de germinación con un pH 6,5 en el agua de remojo ($4,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,6 \cdot 10^{-5}$ U/mg de muestra). En el caso de este estudio, el máximo valor alcanzado fue de $1,1 \cdot 10^{-4} \pm 2,5 \cdot 10^{-5}$ U/mg de muestra a los 6 d de germinación con un pH de 6,5. Comparando ambos resultados, el obtenido en el presente trabajo se encuentra ligeramente por debajo. Esto podría deberse a diferencias en las condiciones de germinación de las semillas o a que Comas-Basté et al. (2020b) consiguieron una mayor extracción de la enzima.

4.1.3.2 Garrofón

En el caso del garrofón, la actividad enzimática media a los 3 d de germinación fue de 0,0018 U/0,05 ml extracto sufriendo un ligero aumento no significativo ($p > 0,05$) a los 6 d (0,0019 U/0,05 ml extracto), y disminuyendo significativamente ($p > 0,05$) a los 9 d (0,0015 U/0,05 ml extracto) (Figura 6). Así, como en guisantes, el tiempo para obtener la máxima actividad enzimática estaría alrededor de los 6 d de germinación. En relación al pH del agua de remojo, a pH 5 se obtuvo una media de actividad enzimática (0,0021 U/0,05 ml extracto) significativamente ($p < 0,05$) superior al resto de pHs, entre los cuales no se observaron diferencias significativas.

La actividad enzimática en el garrofón fue considerablemente más baja que en el caso del guisante (medias de $0,42 \pm 0,10$ U/0,05 ml extracto a 6 d y pH control, y $0,0023 \pm 0,0006$ U/0,05 ml extracto a 6d y pH 5 para guisante y garrofón, respectivamente).

Por otro lado, la actividad enzimática específica (Figura 6) presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los 3-6 d y los 9 d de germinación. En el caso del pH, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes pH ensayados, siendo el pH 5 el que proporcionó la mayor actividad enzimática específica (0,0011 U/mg).

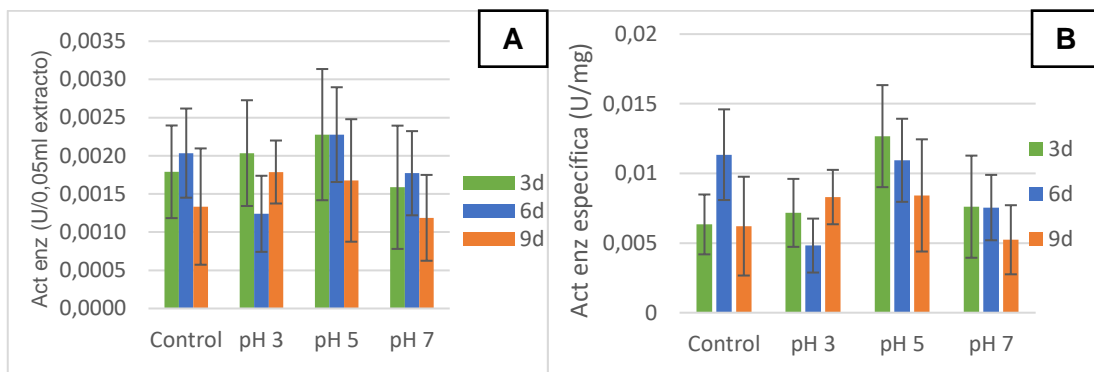


FIGURA 6. Evolución de la actividad enzimática (A) y actividad enzimática específica (B) de semillas de garrofón durante la germinación con remojo previo de las semillas a distintos pHs.

Por último, para el garrofón, tampoco se encontró ninguna relación significativa ($p > 0,05$) entre la longitud del germen y la actividad enzimática.

No se han encontrado estudios de la actividad enzimática de la DAO en garrofón. Sin embargo, comparando con estudios realizados con garbanzo (Mantilla et al., 2002) o soja (Amirjani, 2010), la actividad específica de esta legumbre es claramente inferior.

4.2 Tratamiento con PEF

4.2.1 ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE TRATAMIENTO PEF

En primer lugar, se realizaron varias series de experiencias previas, para determinar las mejores condiciones de aplicación de los pretratamientos con PEF sobre las semillas de guisante y garrofón. Así, en una primera serie

experimental, se ensayó una intensidad de campo de 1 kV/cm y 100, 55 y 10 pulsos. En los tratamientos con 100 y 55 pulsos, las semillas no germinaron adecuadamente y desarrollaron un aspecto viscoso en su superficie al cabo de 24 h del pretratamiento. Esto podría indicar un nivel excesivo de electroporación que facilitó la liberación de componentes internos, lo que además favoreció al crecimiento de moho en superficie. La germinación fue normal en el tratamiento realizado con 10 pulsos.

En una nueva serie experimental, se redujo el número de pulsos aplicados (40, 25 y 10 pulsos) y se aplicó un tratamiento de desinfección con lejía tras el tratamiento de PEF para prevenir el crecimiento de moho. De nuevo, en los tratamientos con 40 y 25 pulsos se volvió a observar la liberación de contenido celular. Además, el tratamiento con lejía después del de PEF impidió la germinación, incluso en las semillas tratadas con 10 pulsos, por lo que se descartó este tratamiento de desinfección.

En una última serie experimental, se decidió reducir la intensidad del campo de 1 kV/cm a 0,65 kV/cm, y limitar el número de pulsos a 10 y 30, para evitar la electroporación excesiva. En este caso, en los tres tratamientos aplicados se observó un desarrollo normal de las semillas, sin la presencia de moho ni exudados.

De esta forma, las condiciones que se fijaron para realizar los tratamientos PEF fueron de 1 kV/cm con aplicación de 10 pulsos y 0,65 kV/cm con 30 y 10 pulsos. En todos los casos se empleó agua destilada (pH 6,5) para el remojo y las semillas se germinaron durante 6 d.

4.2.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO PEF SOBRE LA GERMINACIÓN

4.2.2.1 Desarrollo de las semillas

4.2.2.1.1 Guisantes

La tasa de germinación se situó en torno al 98 % en todos los casos. En cuanto a la longitud del germen (Figura 7), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el tratamiento de 1 kV/cm y 10 pulsos (77 ± 17 mm) y el de 0,65 kV/cm y 10 pulsos (78 ± 20 mm). Estos valores fueron significativamente mayores que los observados para el control ($64,6 \pm 1,3$ mm), lo podría indicar un efecto de estimulación del tratamiento. Por el contrario, las semillas tratadas con 0,65 kV/cm y 30 pulsos tuvieron un crecimiento significativamente ($p < 0,05$) menor (15 ± 5 mm).

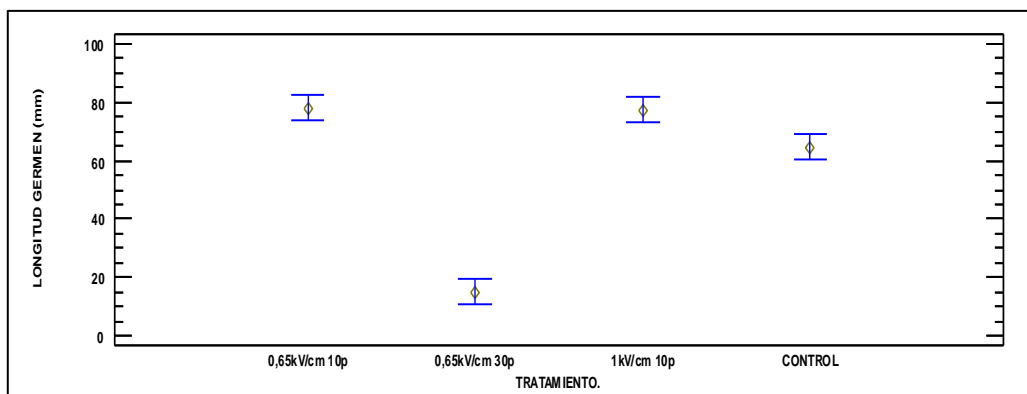


FIGURA 7. Medias e intervalos LSD ($p < 0,05$) para la longitud del germen de semillas de guisante según el tratamiento aplicado.

4.2.2.1.2 Garrofón

En el caso del garrofón, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tres tratamientos aplicados y el control ni en la tasa de germinación ($95 \pm 3\%$) ni en el valor medio de la longitud del germen ($54,5 \pm 0,7$ mm). Por el contrario, hay estudios de aplicación de PEF en garbanzo, trigo (Attri et al., 2022), o cebada (Dymek et al., 2012), en los que se observó un aumento significativo de la longitud del germen.

4.2.3 CONTENIDO PROTEICO

4.2.3.1 Guisantes

Las semillas tratadas con 0,65 kV/cm y 30 pulsos fueron las que mayor contenido proteico presentaron ($0,57 \pm 0,02$ mg/0,05 mL extracto) seguidas de las tratadas con 1 kV/cm y 10 pulsos ($0,53 \pm 0,16$ mg/0,05 mL extracto), y de 0,65 kV/cm y 10 pulsos ($0,38 \pm 0,06$ mg/0,05 mL extracto). Por otra parte, el tratamiento de 0,65 kV/cm y 30 pulsos, fue el único que proporcionó un contenido proteico significativamente ($p < 0,05$) superior al control (Figura 8).

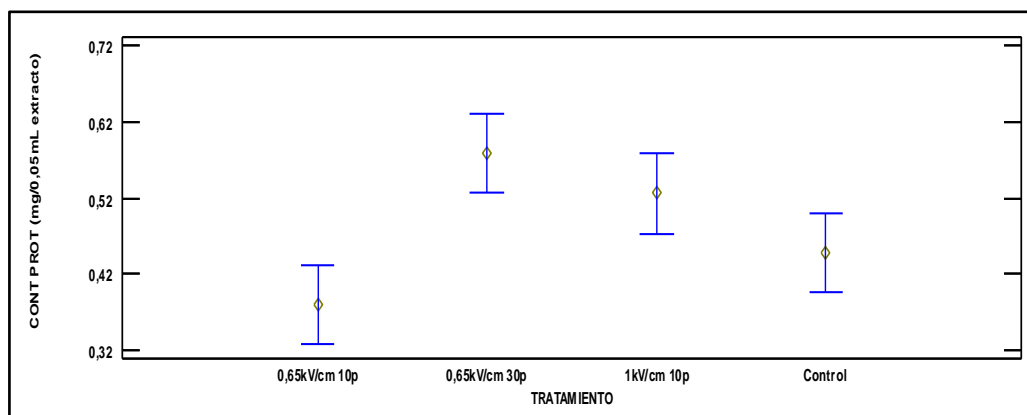


FIGURA 8. Medias e intervalos LSD ($p < 0,05$) para el contenido proteico de semillas de guisante según el tratamiento aplicado.

4.2.3.2 Garrofón

Respecto al garrofón (Figura 9), las semillas tratadas con 0,65 kV/cm y 10 pulsos presentaron un contenido proteico significativamente mayor que las tratadas con 1 kV/cm y 10 pulsos ($0,212 \pm 0,079$ mg/0,05 mL extracto), las tratada con 0,65 kV/cm y 30 pulsos ($0,16 \pm 0,03$ mg/0,05 mL extracto) y las muestras control ($0,28 \pm 0,02$ mg/0,05 mL extracto). Por lo tanto, a diferencia de los guisantes, las semillas sometidas al tratamiento menos intenso fueron las que mayor contenido de proteína tuvieron.

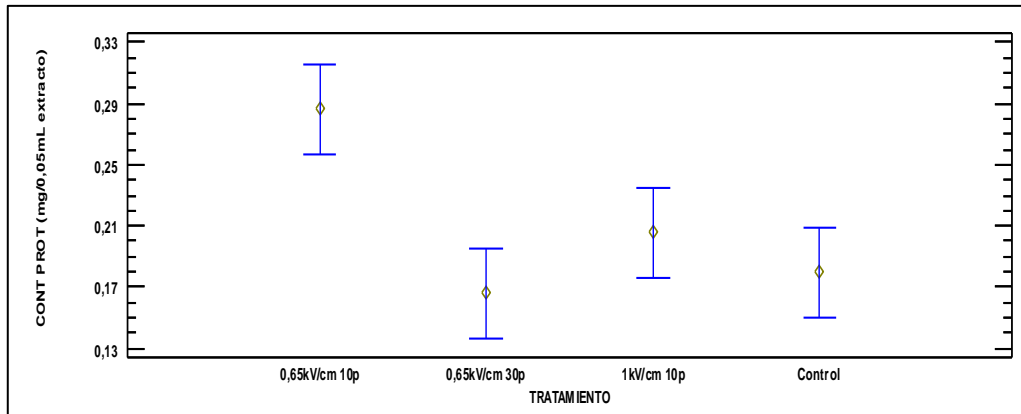


FIGURA 9. Medias e intervalos LSD ($p < 0,05$) para el contenido proteico de semillas de garrofón según el tratamiento aplicado.

Dymek et al. (2012) no observaron diferencias significativas entre las semillas de cebada tratadas con PEF y las no tratadas.

4.2.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

4.2.4.1 Guisantes

Las semillas sometidas al tratamiento de 1 kV/cm y 10 pulsos mostraron una actividad enzimática ($0,336 \pm 0,014$ U/0,05 ml extracto) significativamente ($p < 0,05$) más elevada que las de los otros tratamientos de PEF (Figura 10), sin embargo, fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la del control.

De la misma manera, la actividad enzimática específica (Figura 11) de las semillas sometidas a 1 kV/cm y 10 pulsos ($0,67 \pm 0,14$ U/mg) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la de los otros dos tratamientos con PEF y significativamente ($p < 0,05$) inferior a las muestras control.

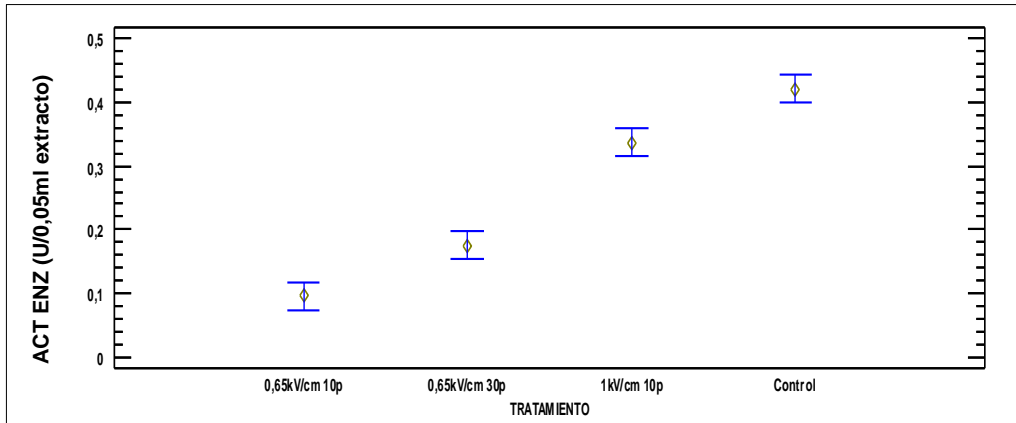


FIGURA 10. Medias e intervalos LSD ($p < 0,05$) para la actividad enzimática de semillas de guisante según el tratamiento aplicado.

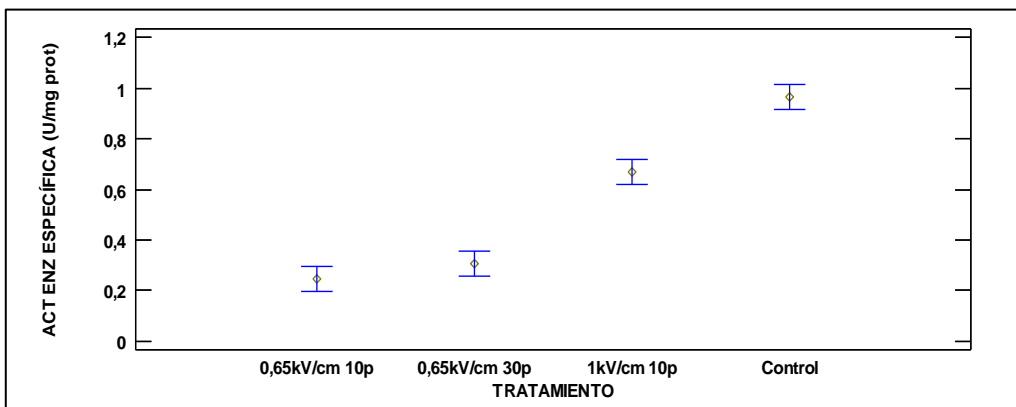


FIGURA 11. Medias e intervalos LSD ($p < 0,05$) para la actividad enzimática específica de semillas de guisante según el tratamiento aplicado.

4.2.4.2 Garrofón

Tanto para la actividad enzimática como para la actividad enzimática específica, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes tratamientos con PEF, ni entre éstos y el control. Así, el valor medio de la actividad enzimática fue de $3 \cdot 10^{-3} \pm 8 \cdot 10^{-4}$ U y el de la actividad enzimática específica de $0,015 \pm 0,005$ U/mg prot.

El hecho de que el tratamiento PEF no haya aumentado la actividad enzimática podría indicar que en las condiciones ensayadas no se produjo un efecto estimulante en la formación de DAO. De hecho, en el caso del guisante, los daños inducidos por el tratamiento disminuyeron la actividad enzimática respecto al control. Otra explicación podría estar relacionada con la elevada variabilidad del proceso de germinación descrito en el apartado 4.1 que podría enmascarar los efectos de los PEF. Así, la germinación de las muestras control se realizó en días diferentes a los de las muestras tratadas con PEF.

Por lo tanto, sería recomendable profundizar en el estudio para determinar la causa de la falta de efecto estimulante del PEF sobre la formación de DAO. Esto implicaría considerar un mayor número de muestras,

ampliar las condiciones del tratamiento PEF, así como efectuar todas las experiencias con muestras germinadas en el mismo momento.

Hay que resaltar que no se ha encontrado bibliografía sobre la aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad en legumbres para el aumento de la actividad enzimática de DAO durante su germinación.

5. CONCLUSIONES

La longitud del germen y el contenido proteico, tanto en el caso del guisante como en el del garrofón, aumentaron con el tiempo de germinación. La actividad enzimática de DAO en ambas semillas fue máxima entre los 3 y 6 d de germinación, disminuyendo a los 9 d. Sin embargo, la máxima actividad enzimática específica se obtuvo a los 3 d de germinación, disminuyendo a partir de ese momento. También se observó un efecto significativo ($p < 0,05$) del pH del agua de remojo sobre la cantidad de DAO formada. Así pues, las condiciones óptimas de germinación identificadas fueron 6 d y pH 6,5 del agua de remojo para guisante, y 6 d y pH 5 del agua de remojo para garrofón.

En cuanto a la aplicación de pretratamientos de PEF, el correspondiente a 1kV/cm y 10 pulsos proporcionó una mayor longitud del germen en guisantes. Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido proteico y la actividad enzimática con las muestras control, siendo mayor en las muestras control. En el caso del garrofón, el tratamiento de 0,65 kV/cm y 10 pulsos proporcionó el mayor contenido proteico y actividad enzimática, aunque no fueron significativamente ($p > 0,05$) diferentes que los de las muestras control.

Por último, resaltar que las semillas de guisante presentaron un mayor contenido proteico, una mayor actividad enzimática y una mayor actividad específica que las de garrofón, por lo que supondrían una fuente de DAO más interesante y efectiva.

Este estudio contribuye a la ODS de Salud y Bienestar al abordar la reducción de la formación de histamina en los alimentos y mejorar la obtención de DAO para ofrecer opciones dietéticas más seguras y adecuadas para aquellos con deficiencias en el metabolismo de la histamina. Además, se relaciona con la ODS de Industria, Innovación e Infraestructuras al destacar la importancia de la innovación en la obtención de DAO de fuentes vegetales mediante tecnologías como los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF), impulsando la industria alimentaria y promoviendo la producción sostenible de alimentos.

6. REFERENCIAS

- Ahmed, Z., Manzoor, M. F., Ahmad, N., Zeng, X. A., Din, Z. ud, Roobab, U., Qayum, A., Siddique, R., Siddeeg, A., & Rahaman, A. (2020). Impact of pulsed electric field treatments on the growth parameters of wheat seeds and nutritional properties of their wheat plantlets juice. *Food Science and Nutrition*, 8(5), 2490–2500.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1540>

- Amirjani, M. R. (2010). Effect of salinity stress on growth, mineral composition, proline content, antioxidant enzymes of soybean. *American Journal of Plant Physiology*, 5(6). <https://doi.org/10.3923/ajpp.2010.350.360>
- Attri, P., Okumura, T., Koga, K., Shiratani, M., Wang, D., Takahashi, K., & Takaki, K. (2022). Outcomes of Pulsed Electric Fields and Nonthermal Plasma Treatments on Seed Germination and Protein Functions. In *Agronomy* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020482>
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2020a). Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance. *LWT*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109201>
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2019a). In vitro determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(28), 7595–7602. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02178-2>
- Comas-Basté, O., Luz Latorre-Moratalla, M., Sánchez-Pérez, S., Teresa Veciana-Nogués, M., & del Carmen Vidal-Carou, M. (2019b). Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance. In *Biogenic Amines*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84333>
- Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M., & Vidal-Carou, M. D. C. (2020b). Histamine intolerance: The current state of the art. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 8, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10081181>
- Dymek, K., Dejmek, P., Panarese, V., Vicente, A. A., Wadsö, L., Finnie, C., & Galindo, F. G. (2012). Effect of pulsed electric field on the germination of barley seeds. *LWT*, 47(1), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.019>
- Gomez-Gomez, A., Brito-de la Fuente, E., Gallegos, C., Garcia-Perez, J. V., & Benedito, J. (2021). Combined pulsed electric field and high-power ultrasound treatments for microbial inactivation in oil-in-water emulsions. *Food Control*, 130, 108348. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108348>
- Jemai, A. B., & Vorobiev, E. (2006). Pulsed electric field assisted pressing of sugar beet slices: Towards a novel process of cold juice extraction. *Biosystems Engineering*, 93(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2005.09.008>
- Kettner, L., Seitzl, I., & 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>
- Kruger, N. J. (n.d.). *The Bradford Method For Protein Quantitation*.
- López Rodríguez, R. J. (2017). *Evaluación de la efectividad en la aplicación de tres tratamientos de un sistema no térmico para la reducción de carga bacteriana (electroporación) en forma artesanal, en leche de vaca de dos explotaciones lecheras familiares, ubicadas en el municipio de Mixco*.
- Maintz, L., & Novak, N. (2007). *Histamine and histamine intolerance* 13.
- Mantilla, A. J., García, S., & Bueno, M. (2002). Diamine oxidase activity during the germinative and post-germinative growth of the embryonic axis in chickpea seeds. *Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de*

Compostela y Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología, Área de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias Experimentales y de La Salud, Universidad de Jaén.

- Martín Municio, E., & Raso Pueyo, J. (2018). *Aplicaciones de los pulsos eléctricos de alto voltaje para el procesado y conservación de alimentos. Trabajo fin de grado en veterinaria.*
- Maza, M. A., Martínez, J. M., Sladaña, G., Ballesteros, F., Álvarez, I., & Raso, J. (2017). *Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF), una tecnología innovadora en el proceso de elaboración de vinos.* [https://www.interempresas.net/Vitivinicola/Articulos/184363-Pulsos-Elctricos-Alto-Voltaje-\(PEF\)-tecnologia-innovadora-proceso-elaboracion-vinos.html](https://www.interempresas.net/Vitivinicola/Articulos/184363-Pulsos-Elctricos-Alto-Voltaje-(PEF)-tecnologia-innovadora-proceso-elaboracion-vinos.html)
- Nowosad, K., Sujka, M., Pankiewicz, U., & Kowalski, R. (2021). The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *Journal of Food Science and Technology*, 58. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04512-4>
- Ostermeier, R., Parniakov, O., Töpfl, S., & Jäger, H. (2020). Applicability of pulsed electric field (PEF) pre-treatment for a convective two-step drying process. *Foods*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/foods9040512>
- Puértolas, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). *Los pulsos eléctricos de alto voltaje: una alternativa para mejorar la extracción fenólica en la elaboración del vino tinto.* <https://www.researchgate.net/publication/283356946>
- Reglamento de Ejecución (UE) 2018/ de la Comisión, de 23 de julio de 2018, que corrige el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 por el que se establece la lista de la Unión de nuevos alimentos.* (n.d.). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/novel_food_authorisation_2015_auth-letter_
- San Mauro Martin, I., Brachero, S., & Garicano Vilar, E. (2016). Histamine intolerance and dietary management: A complete review. In *Allergologia et Immunopathologia* (Vol. 44, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.04.015>
- Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. (2011). *EFSA Journal*, 9(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- Torrucó-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT*, 42(10), 1597–1604. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.006>
- Vivanco, D., Ardiles, P., Castillo, D., & Puente, L. (2021). Tecnología emergente: Campo de pulsos eléctricos (PEF) para el tratamiento de alimentos y su efecto en el contenido de antioxidantes. *Revista Chilena de Nutrición*. https://scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182021000400609&script=sci_arttext
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Riener, J., Cronin, D. A., Lyng, J. G., & Morgan, D. J. (2009). The impact of thermosonication and pulsed electric fields on *Staphylococcus aureus* inactivation and selected quality parameters in orange juice. *Food and Bioprocess Technology*, 2(4), 422–430. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0045-7>
- Walter, L., Knight, G., Ng, S. Y., & Buckow, R. (2016). Kinetic models for pulsed electric field and thermal inactivation of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* in whole milk. *International Dairy Journal*, 57, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.01.027>

ANEXO

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	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 infraestructuras.		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
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto:

Salud y Bienestar (ODS 3): Al abordar la reducción de la formación de histamina en los alimentos y mejorar la obtención de DAO, se contribuye a mejorar la salud y el bienestar de las personas al ofrecer opciones dietéticas más seguras y adecuadas para aquellos con deficiencias en el metabolismo de la histamina.

Industria, Innovación e Infraestructuras (ODS 9): La investigación de tecnologías de intensificación en los procesos de extracción, como los PEF,

para mejorar el rendimiento en la obtención de DAO destaca la importancia de la innovación en el campo de la alimentación y la producción de enzimas. El desarrollo y aplicación de nuevas técnicas y tecnologías para obtener DAO de fuentes vegetales podrían impulsar la industria alimentaria y promover la producción sostenible de alimentos.

Producción y Consumo Responsables (ODS 12): La investigación de estrategias para reducir la formación de histamina en los alimentos y la aplicación de tecnologías emergentes para la obtención y extracción de DAO refleja un enfoque en la producción responsable de alimentos. Al buscar formas más sostenibles y seguras de producir alimentos, se promueve un consumo más responsable y consciente.

Acción por el Clima (ODS 13): El uso de tecnologías de intensificación en los procesos de obtención de DAO, como los PEF, podría tener un impacto en la huella de carbono de la producción alimentaria. Si estas tecnologías ayudan a mejorar la eficiencia en la extracción de DAO de fuentes vegetales y reducir la formación de histamina en los alimentos, podrían contribuir indirectamente a la acción por el clima al impulsar prácticas más sostenibles en la industria alimentaria.