



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

Impacto de la adición de Diamino Oxidasa encapsulada y  
sin encapsular sobre el contenido en histamina en queso  
curado elaborado con leche de cabra.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Montero Escrivá, Tania

Tutor/a: Hernando Hernando, María Isabel

Cotutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados

Director/a Experimental: Duch Calabuig, Aitana

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

**Título:** Impacto de la adición de Diamino Oxidasa encapsulada y sin encapsular sobre el contenido en histamina en queso curado elaborado con leche de cabra.

**Resumen:** La histamina es una amina biógena que se sintetiza por la descarboxilación de su aminoácido precursor, la L-histidina, gracias a la acción de la enzima L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). La histamina puede originarse en los alimentos por acción de las bacterias con actividad descarboxilasa, que principalmente aparecen, durante los procesos de maduración o fermentación o durante el deterioro de los alimentos. Algunos de los alimentos que comúnmente contienen histamina son el vino tinto, las carnes fermentadas y los quesos curados, entre otros. El consumo de estos alimentos y/o un déficit de la enzima Diamino Oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6), responsable de la metabolización de la histamina durante la digestión, pueden producir una acumulación de histamina en nuestro sistema circulatorio, también conocido como histaminosis. Actualmente, existen suplementos de DAO en forma de cápsulas que se utilizan como tratamiento ante la histaminosis. Sin embargo, estos suplementos se obtienen a partir de riñón de cerdo y no tienen una actividad enzimática elevada. Es por esto que, se están estudiando nuevas fuentes de DAO, principalmente de origen vegetal, y con una mayor actividad enzimática. Además, la adición de la DAO durante la elaboración de los alimentos podría disminuir el contenido en histamina y asegurar un consumo seguro.

El objetivo de este trabajo es determinar si la adición de DAO de guisante a quesos curados elaborados con leche de cabra permite disminuir su contenido en histamina. Además, se evalúa la efectividad de la encapsulación de la DAO. Para ello, la DAO de guisante se añade encapsulada y sin encapsular antes de la maduración de los quesos y se determina el contenido en histamina mediante HPLC.

Los resultados muestran que concentraciones de DAO de 30 mg DAO/mg histamina permiten disminuir en gran medida el contenido en histamina del queso, pudiendo llegar a reducciones de un 47%. Por otro lado, la DAO encapsulada parece ser más estable y presenta mayor actividad que la liofilizada al final del periodo de maduración.

**Palabras clave:** Actividad enzimática; HPLC; DAO; histaminosis

**Title:** Impact of the addition of encapsulated and unencapsulated diamine oxidase on the histamine content in cured cheese made from goat's milk.

**Abstract:** Histamine is a biogenic amine that is synthesized by the decarboxylation of its precursor amino acid, L-histidine, through the action of the enzyme L-histidine decarboxylase (EC.4.1.1.22). Histamine can originate in foods by the action of bacteria with decarboxylase activity, which mainly occur during the ripening or fermentation processes or during food spoilage. Some of the foods that commonly contain histamine are red wine, fermented meats and cured cheeses, among others. The consumption of these foods and/or a deficit of the enzyme Diamine Oxidase (DAO, EC.1.4.3.6), responsible for the metabolization of histamine during digestion, can lead to an accumulation of histamine in our circulatory system, also known as histaminosis. Currently, there are DAO supplements in capsule form that are used as a treatment for histaminosis. However, these supplements are obtained from pig kidney and do not have a high enzymatic activity. For this reason, new sources of DAO, mainly of vegetable origin, and with higher enzymatic activity, are being studied. In addition, the addition of DAO during food processing could decrease the histamine content and ensure safe consumption.

The aim of this work is to determine whether the addition of pea DAO to cured cheeses made with goat milk reduces their histamine content. In addition, the effectiveness of DAO encapsulation is evaluated. For this purpose, pea DAO is added encapsulated and unencapsulated before cheese ripening and the histamine content is determined by HPLC.

The results show that DAO concentrations of 30 mg DAO/mg histamine greatly reduced the histamine content of the cheese, with reductions of up to 47%. On the other hand, encapsulated DAO seems to be more stable and shows higher activity than freeze-dried DAO at the end of the ripening period.

**Keywords:** Enzymatic activity; HPLC; DAO; histaminosis

**Títol:** Impacte de l'addició de Diamino Oxidasa encapsulada i sense encapsular sobre el contingut en histamina en formatge curat elaborat amb llet de cabra.

**Resum:** La histamina és una amina biògena que se sintetitza per la descarboxilació del seu aminoàcid precursor, la L-histidina, gràcies a l'acció de l'enzim L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). La histamina pot originar-se en els aliments per acció dels bacteris amb activitat descarboxilasa, que principalment apareixen, durant els processos de maduració o fermentació o durant la deterioració dels aliments. Alguns dels aliments que comunament contenen histamina són el vi negre, les carns fermentades i els formatges curats, entre altres. El consum d'aquests aliments i/o un dèficit de l'enzim Diamino Oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6), responsable de la metabolització de la histamina durant la digestió, poden produir una acumulació d'histamina en el nostre sistema circulatori, també conegut com a histaminosi. Actualment, existeixen suplementes de DAO en forma de càpsules que s'utilitzen com a tractament davant la histaminosi. No obstant això, aquests suplementes s'obtenen a partir de ronyó de porc i no tenen una activitat enzimàtica elevada. És per això que, s'estan estudiant noves fonts de DAO, principalment d'origen vegetal, i amb una major activitat enzimàtica. A més, l'addició de la DAO durant l'elaboració dels aliments podria disminuir el contingut en histamina i assegurar un consum segur.

L'objectiu d'aquest treball és determinar si l'addició de DAO de pèsol a formatges curats elaborats amb llet de cabra permet disminuir el seu contingut en histamina. A més, s'avalua l'efectivitat de l'encapsulació de la DAO. Per a això, la DAO de pèsol s'afegeix encapsulada i sense encapsular abans de la maduració dels formatges i es determina el contingut en histamina mitjançant HPLC.

Els resultats mostren que concentracions de DAO de 30 mg DAO/mg histamina permeten disminuir en gran manera el contingut en histamina del formatge, podent arribar a reduccions d'un 47%. D'altra banda, la DAO encapsulada sembla ser més estable i presenta major activitat que la liofilitzada al final del període de maduració.

**Paraules clau:** Activitat enzimàtica; DAO; HPLC; histaminosi

Autora: Montero Escrivá, Tania

Tutora: Hernando Hernando, Isabel

Cotutora: Quiles Chuliá, Amparo

Director/a Experimental: Duch Calabuig, Aitana

València, julio de 2024

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer a toda la gente que ha estado a mi lado durante la realización de este trabajo. Han sido unos meses de mucho trabajo y esfuerzo que no hubiera podido conseguir sin todos vosotros.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras, Dra Isabel Hernando y Dra Amparo Quiles, por brindarme la oportunidad de formar parte de este trabajo, por su tiempo y dedicación.

A mi directora experimental, Aitana Duch, por acompañarme en todo el proceso de laboratorio, por sus horas invertidas y por su capacidad de encontrar siempre la solución perfecta cuando los resultados no eran los esperados.

Agradecer al equipo de la CPI, en especial a Paola y Ana Fuentes, por hacerme sentir como en casa durante tiempo que pasé en el laboratorio.

También agradecer a M<sup>a</sup> Carmen, del departamento de investigación animal, por su gran dedicación y ayuda en el proceso de elaboración de los quesos.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional y por ser un pilar fundamental en los momentos más desafiantes de este proyecto, gracias por ser un ejemplo a seguir, nada de esto hubiese sido posible sin vosotros. También a mi segunda familia, a la que ya tenía y a la que he ido conociendo durante estos cuatro años, gracias por hacerme sentir como en casa cuando estaba tan lejos, por los días de llamada infinitas y los recuerdos inolvidables. Gracias a todos por creer en mi cuando ni yo misma lo hacía.

**T'estimu!**

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1 La histamina.....	11
1.2 Metabolismo de la histamina.....	12
1.3 Histamina en quesos .....	14
1.4 Importancia de la enzima DAO .....	15
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	17
2.1 Objetivo general.....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
2.3 Plan de trabajo.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
3.1 Materia prima .....	18
3.1.2 Proceso de elaboración de los quesos .....	18
3.2 Caracterización de los quesos .....	20
3.2.1 Determinación de pH.....	20
3.2.2 Determinación de la actividad de agua.....	20
3.2.3 Determinación del contenido en sal.....	21
3.2.4 Determinación del contenido en humedad.....	21
3.3 Determinación del contenido de histamina por HPLC.....	22
3.3.1 Obtención del extracto.....	22
3.3.2 Derivatización .....	23
3.3.3 Determinación del contenido en histamina .....	24
3.4 Análisis estadístico .....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1 Caracterización de los quesos .....	26
4.2 Determinación del contenido en histamina por HPLC.....	28
5. CONCLUSIONES.....	29
6. BIBLIOGRAFÍA .....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Síntesis de histamina. (Comas-Basté et al., 2020b).....	11
<b>Figura 2.</b> Degradación de la histamina en el intestino. (A) Individuo sano. Concentración normal de histamina en los alimentos. La mayor parte de la histamina es inactivada por las enzimas DAO y HMT en el intestino y solo una pequeña cantidad de histamina pasa al torrente sanguíneo y no causa síntomas mediados por la histamina. (B) Intoxicación por histamina. Ingestión de alimentos con alto contenido de histamina (más de 500 mg/kg) por individuo sano. La actividad enzimática de DAO y HMT es normal, pero insuficiente para inactivar la cantidad excesiva de histamina. La histamina pasa al torrente sanguíneo y provoca síntomas mediados por histamina. (C) Intolerancia a la histamina. En individuos con intolerancia a la histamina, la actividad enzimática de DAO y HMT en el intestino está disminuida o inhibida e insuficiente para inactivar la histamina de un alimento con una concentración normal de histamina. La histamina pasa al torrente sanguíneo y provoca síntomas mediados por la histamina (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015). .....	13
<b>Figura 3.</b> Quesos en la cámara de maduración.....	20
<b>Figura 4.</b> Queso homogenizado con la arena después de pasar por la estufa.....	22
<b>Figura 5.</b> Recuperación del sobrenadante con papel de filtro. ....	23
<b>Figura 6.</b> Filtración de los extractos derivatizados con filtros de jeringa de politetrafluoroetileno de tamaño de poro 0,45 $\mu\text{m}$ .....	24
<b>Figura 7.</b> Cromatografo LaChrom Elite® (VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvania, EEUU.).....	25
<b>Figura 8.</b> Contenido en histamina (ppm) de los quesos. S0= principio de la maduración, S4= final de la maduración.....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla1</b> . <i>Grado de relación del trabajo con los ODS de la Agenda 2030</i> .....	9
<b>Tabla 2</b> . <i>Contenido en aw, pH, humedad y sal de los quesos: Q, QH, QHDlio [a], QHDlio [b], QHDencap [a] y QHDencap [b]</i> .....	26

**Tabla1.** Grado de relación del trabajo con los ODS de la Agenda 2030.

	Alto	Medio	Bajo	No Procede
<b>ODS 1.</b> Fin de la pobreza.				X
<b>ODS 2.</b> Hambre cero.				X
<b>ODS 3.</b> Salud y bienestar	X			
<b>ODS 4.</b> Educación de calidad.				X
<b>ODS 5.</b> Igualdad de género.				X
<b>ODS 6.</b> Agua limpia y saneamiento.				X
<b>ODS 7.</b> Energía asequible y no contaminante.				X
<b>ODS 8.</b> Trabajo decente y crecimiento económico.				X
<b>ODS 9.</b> Industria, innovación e infraestructuras.	X			
<b>ODS 10.</b> Reducción de las desigualdades.				X
<b>ODS 11.</b> Ciudades y comunidades sostenibles				X
<b>ODS 12.</b> Producción y		X		

consumo responsables.				
<b>ODS 13.</b> Acción por el clima.			X	
<b>ODS 14.</b> Vida submarina.				X
<b>ODS 15.</b> Vida de ecosistemas terrestres.	X			
<b>ODS 16.</b> Paz, justicia e instituciones sólidas				X
<b>ODS 17.</b> Alianzas para lograr objetivos.				X

### **ODS 3.** Salud y bienestar

La reducción de la histamina en quesos está estrechamente ligada con el ODS 3 de Salud y Bienestar porque lucha por encontrar una mejora en la seguridad alimentaria para así poder disminuir los riesgos de salud pública de la población con intolerancia a la histamina. También contribuye en garantizar alimentos seguros y así proporcionar un bienestar para toda la población.

### **ODS 9.** Industria, innovación e infraestructuras

Este objetivo pone su foco en la promoción de una industrialización inclusiva y sostenible, es por eso que el desarrollo de nuevas técnicas para reducir la histamina en quesos está estrechamente relacionado con el ODS 9. La reducción de histamina en quesos curados con inyección de DAO de origen vegetal además es un avance para la sociedad ya que pretende abarcar a la mayoría de la población ampliando el rango de consumidores por la utilización de productos aptos para consumidores con preferencias veganas y vegetarianas. La implementación de nuevas técnicas en la industria mejora tanto el sector de la industria alimentaria como el desarrollo económico y el bienestar social.

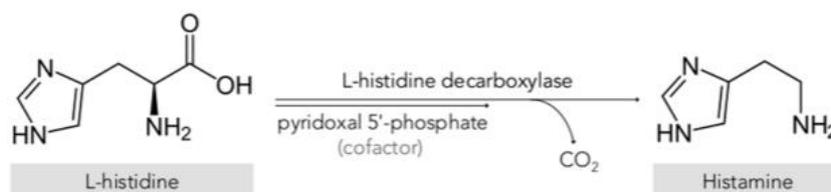
### **ODS 15.** Vida de ecosistemas terrestres.

La relación que guarda la utilización de una opción vegetal para la disminución de histamina en quesos curados con el ODS 15 es clave para luchar contra la deforestación y degradación de las tierras y para detener la pérdida de la biodiversidad. La DAO vegetal no solo mejora la seguridad y calidad de los productos alimentarios, sino que también promueve una conservación de los ecosistemas terrestres debido a que frena la deforestación y fomenta un enfoque más sostenible y respetuoso del medio ambiente en la industria alimentaria.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La histamina

La histamina es una amina biógena que se sintetiza por la descarboxilación del aminoácido L-histidina (Figura 1) mediante la acción de la enzima histidina descarboxilasa (EC 4.1.1.22).



**Figura 1.** Síntesis de histamina. (Comas-Basté et al., 2020b)

La histamina presente en nuestro organismo puede tener un origen endógeno o exógeno.

La histamina endógena, se sintetiza en los mastocitos y basófilos (granulocitos) del sistema inmunitario. En estas células del torrente sanguíneo, la histamina se almacena en gránulos. Cuando el cuerpo necesita una respuesta rápida, como ocurre durante una reacción alérgica, estos gránulos liberan histamina. También se sintetiza histamina en algunas neuronas del sistema nervioso central, donde actúa como un neurotransmisor, ayudando a regular funciones como el sueño, el apetito y la memoria. Otros órganos capaces de sintetizar histamina son las células enterocromafines del estómago que liberan histamina para estimular la producción de ácido gástrico durante la digestión (Comas-Basté et al., 2020b). Además, la histamina cumple diversas funciones en el organismo, por ejemplo, estimula directamente el corazón aumentando tanto su contractilidad como el ritmo y la fuerza de las contracciones y provoca la contracción o relajación de los músculos lisos (Stratton et al., 1991). La histamina es una molécula que envían señales entre células. Los efectos de esta amina están mediados por su unión a receptores de membrana de varios tipos celulares. Actualmente, se han descrito cuatro subtipos de receptores de histamina: H1R, H2R, H3R y H4R. Todos ellos acoplados a proteínas G, que son moléculas transmembrana heptahelicoidales (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015).

Por otro lado, la histamina exógena es aquella que llega al organismo, a través del epitelio intestinal, tras la ingesta de algunos alimentos. La histamina y otras aminas biógenas pueden estar presentes en alimentos que han sufrido un proceso de maduración como el queso curado, el chucrut, el vino y la carne procesada; también se detecta en ocasiones en el pescado y otros productos del mar. Para que se formen estas aminas es necesario que el alimento, además de contener aminoácidos libres (precursores de histamina) y microorganismos con actividad descarboxilasa, esté

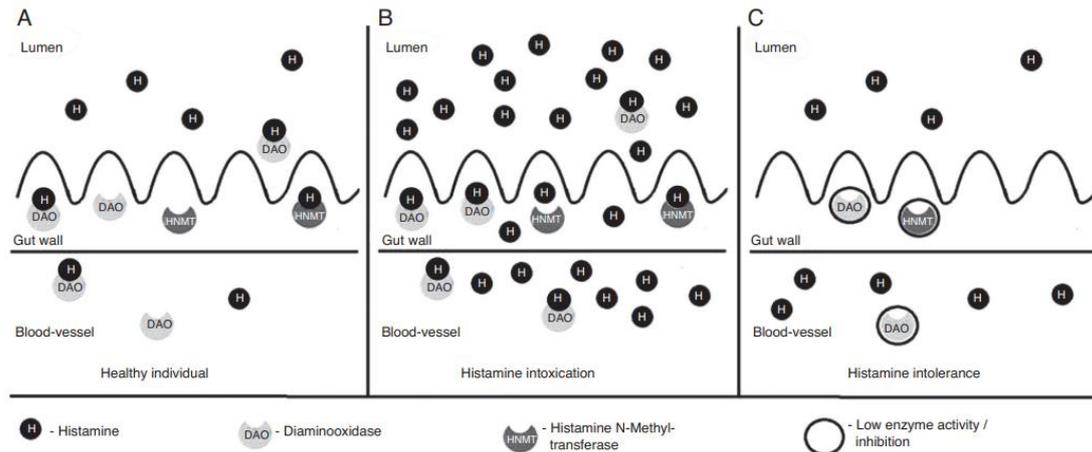
sometido a condiciones que favorezcan el crecimiento de estos microorganismos. Los aminoácidos libres están presentes en todos los alimentos y, además, pueden ser liberados por proteólisis durante su procesamiento o almacenamiento. Muchas bacterias y algunas levaduras tienen una alta actividad de la enzima histidina descarboxilasa (HDC), lo que les permite formar histamina. De este modo, la presencia de histamina, y de otras aminas biógenas como la tiramina, putrescina y cadaverina se usa como indicador de la calidad higiénica de los alimentos.

## **1.2 Metabolismo de la histamina**

La degradación de la histamina en el organismo es enzimática y puede seguir dos rutas metabólicas diferentes dependiendo de si la histamina es de origen endógeno o exógeno. La enzima histamina-N-metiltransferasa (HMT, EC 2.1.1.8) es la responsable de degradar, principalmente, la histamina endógena (Stratton et al., 1991). La HMT convierte la histamina endógena en N-metilhistamina, que luego puede ser oxidada a N-metilimidazolacético. La enzima diamino oxidasa (DAO, EC 1.4.3.6) se encuentra, mayoritariamente, en el epitelio intestinal y convierte la histamina exógena en ácido imidazolacético (IAA), que puede conjugarse con ribosa antes de ser excretado. Aunque la enzima HMT también está presente en el tracto gastrointestinal, la DAO es la que se expresa en este órgano en mayor medida, por lo que, es la principal encargada de neutralizar la histamina procedente de los alimentos consumidos o la generada por la microbiota intestinal. Los productos finales del metabolismo de la histamina endógena y exógena son excretados en la orina.

### Histaminosis

Tanto la presencia de elevadas cantidades de histamina exógena en el lumen intestinal como la baja actividad de la enzima DAO pueden favorecer que esta amina atraviese la barrera gastrointestinal, se acumule en el torrente sanguíneo y, por lo tanto, genere graves problemas en el organismo. La acumulación de histamina en el torrente sanguíneo se denomina histaminosis y puede producir intoxicación por histamina (Stratton et al., 1991) o intolerancia a la histamina. La intoxicación se debe, principalmente, al consumo de alimentos con alto contenido en histamina (más de 500 mg/kg) y la intolerancia a una baja actividad de la DAO (Figura 2).



**Figura 2.** Degradación de la histamina en el intestino. (A) Individuo sano. Concentración normal de histamina en los alimentos. La mayor parte de la histamina es inactivada por las enzimas DAO y HMT en el intestino y solo una pequeña cantidad de histamina pasa al torrente sanguíneo y no causa síntomas mediados por la histamina. (B) Intoxicación por histamina. Ingestión de alimentos con alto contenido de histamina (más de 500 mg/kg) por individuo sano. La actividad enzimática de DAO y HMT es normal, pero insuficiente para inactivar la cantidad excesiva de histamina. La histamina pasa al torrente sanguíneo y provoca síntomas mediados por histamina. (C) Intolerancia a la histamina. En individuos con intolerancia a la histamina, la actividad enzimática de DAO y HMT en el intestino está disminuida o inhibida e insuficiente para inactivar la histamina de un alimento con una concentración normal de histamina. La histamina pasa al torrente sanguíneo y provoca síntomas mediados por la histamina (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015).

Los síntomas típicos de la histaminosis incluyen erupción cutánea, enrojecimiento de la piel, sudoración, náuseas, vómitos, diarrea, sensación de quemazón en la boca, hinchazón de la lengua y la cara, dolores de cabeza, dificultad para respirar, palpitaciones e hipotensión. Estos síntomas pueden persistir durante unas horas o incluso un día, aunque en raras ocasiones pueden durar varios días.

Hasta ahora, la solución más efectiva para evitar la histaminosis por exceso de histamina exógena ha sido limitar la ingesta de alimentos ricos en histamina. Sin embargo, seleccionar los alimentos adecuados puede ser complicado, ya que los fabricantes no detallan las cantidades de histamina en los productos. Además de la ingesta de alimentos, también es recomendable limitar la ingesta de sustancias que estimulen la liberación endógena de histamina y/o que puedan inhibir la actividad de la DAO y la HMT. Existen medicamentos de uso habitual, como analgésicos y antiinflamatorios, que pueden interferir en la actividad de la DAO y por lo tanto en el metabolismo de la histamina (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015).

Varios países han establecido límites máximos de histamina en los alimentos comerciales debido a los efectos adversos que puede provocar esta sustancia. El Comité de Expertos de Salud Pública de la FAO/OMS determinó que un nivel recomendado máximo seguro de histamina, podría ser 200 ppm; este valor se basa en que una porción máxima de marisco de 250 g puede contener unos 200 mg histamina/kg. Por otra parte, La Comisión Internacional para Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF) clasifica la presencia de histamina como de riesgo moderado, ya que, generalmente, no pone en peligro la vida y produce síntomas autolimitados y de corta duración, aunque puede causar molestias graves (DeBeer et al., 2021).

### 1.3 Histamina en quesos

El queso es el segundo alimento más frecuentemente asociado a las intoxicaciones por histamina, después del pescado (Stratton et al., 1991) La acumulación de histamina en quesos durante su maduración es un problema de salud pública, que según Zodolec et al., (2021) está producida por las bacterias ácido lácticas con capacidad descarboxilasa. En el queso, así como en los productos lácteos en general, varias bacterias pueden producir histamina a través de la descarboxilación de la histidina presente en el alimento. Entre ellas destacan las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus spp.*) que incluye varias especies, como *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus hilgardii*, productoras de histamina. Dentro del género *Enterococcus spp.*, las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* también pueden producir histamina en productos lácteos fermentados. Algunas cepas de *Lactococcus lactis*, que son comúnmente utilizadas en la producción de quesos, pueden ser responsables de la producción de histamina. Especies del género *Staphylococcus spp.*, como *Staphylococcus xylosum* y *Staphylococcus carnosus* pueden producir histamina, especialmente en condiciones donde se produce una fermentación mixta. También algunas especies del género *Pediococcus spp.*, como *Pediococcus acidilactici*, pueden producir histamina en productos lácteos fermentados. (Taylor et al., 1986). La producción de histamina por estas bacterias depende de varios factores, incluidos las condiciones de almacenamiento, la temperatura, el pH, la disponibilidad de histidina y la presencia de otras bacterias que pueden competir por los mismos nutrientes. Controlar estos factores puede ayudar a minimizar la formación de histamina en los productos lácteos fermentados (Moniete et al., 2021).

El primer caso documentado de intoxicación por histamina relacionada con el queso ocurrió en los Países Bajos en el año 1967, donde una persona enfermó después de consumir queso Gouda. En 1978, se produjo un brote significativo de intoxicación histamínica en Estados Unidos que afectó a 38 personas y se relacionó también con el queso Gouda. También se han descrito varios casos de intoxicación por histamina en pacientes que recibieron tratamiento con isoniazida, un medicamento utilizado para tratar la tuberculosis. Uno de estos casos involucró al queso Cheddar, mientras que el otro se asoció con el consumo de queso Cheshire (Taylor et al., 1986).

Debido a la gran preocupación actual por la acumulación de aminas biógenas en los alimentos fermentados como el queso, se realizó un estudio que trataba con alta presión los quesos en los días 21 y 35 de su maduración. Los resultados que se obtuvieron fueron muy prometedores ya que en el día 1 se comprobó que no existían aminas biógenas, pero en el 21 sí; es decir, según pasaban los días las concentraciones de estas aumentaban y una de las aminas más abundantes era la histamina. Con el tratamiento de alta presión que se aplicaba se reducían los microorganismos descarboxilasa positivos, que son los responsables de la formación de la histamina. Por esto, se pudo afirmar que la presurización disminuía las poblaciones de microorganismos con capacidad descarboxilasa, así como las enzimas correspondientes (Calzada et al., 2013).

#### **1.4 Importancia de la enzima DAO**

La enzima diamino oxidasa (DAO) es una proteína enzimática almacenada en altas concentraciones en las células epiteliales del intestino delgado, especialmente en el yeyuno y el íleon. Es aquí donde desempeña un papel crucial en la degradación de la histamina ingerida con los alimentos (Comas-Basté et al., 2020b). En el intestino, la actividad de la DAO aumenta gradualmente desde el duodeno hasta el íleon, concentrándose principalmente en las vellosidades intestinales. Además, la DAO también puede metabolizar otras aminas biógenas como la putrescina y la cadaverina (Comas-Basté et al., 2020b). Además del intestino, los riñones también contienen una cantidad significativa de DAO y participa en la eliminación de histamina y otras aminas biogénicas. Durante el embarazo, también la placenta presenta una alta actividad de DAO, protegiendo al feto de niveles excesivos de histamina que podrían ser perjudiciales. Aunque en menores cantidades, la DAO puede encontrarse en el hígado, el timo y ciertas partes del sistema nervioso central. La distribución y concentración de DAO en estos tejidos es importante para la regulación de los niveles de histamina en el organismo, ayudando a prevenir reacciones adversas y manteniendo el equilibrio homeostático.

Para que la enzima DAO funcione correctamente, es importante la presencia de cofactores como las vitaminas B6 y C y el cobre. Una vez producido el estímulo, su mecanismo de acción comienza con su unión a la membrana plasmática de la célula para que se produzca su liberación a la circulación sanguínea. La DAO se excreta constantemente en la luz intestinal, lo que permite que, en una persona sana, la histamina de los alimentos sea en gran medida neutralizada en el intestino (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015).

Puesto que seguir una dieta baja en histamina no es la opción más eficaz para tratar la histaminosis, actualmente, se está empleando para este propósito la suplementación con DAO exógena, mayoritariamente de origen animal. La Comisión Europea ha otorgado la autorización, como nuevo alimento, al extracto de proteína de riñón de porcino con actividad DAO, que se comercializa como suplemento alimenticio en forma de cápsulas con recubrimiento entérico (UE 2018/1023). La cápsula de DAO contiene una cubierta externa de celulosa que a su vez está recubierta con goma laca

para resistir los ácidos. Con la encapsulación de la DAO se busca resistencia al medio ácido del estómago humano para que alcance y se disuelva en el intestino humano. (Kettner et al., 2020).

La DAO, que se obtiene del riñón de cerdo, tienen una baja eficacia en cuanto a reducción de histamina, ya que, tan solo es capaz 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 combinarla con una dieta baja en histamina (Kettner et al., 2020). Además, al ser la DAO un producto de origen animal, no cumple con los requisitos, cada vez más habituales, de los consumidores que prefieren dietas basadas en alimentos de origen vegetal y exentas de componentes de origen animal. Todo ello, ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de DAO. Las investigaciones orientadas a la obtención de DAO de origen vegetal y de elevada actividad permitirían obtener un producto alineado con las tendencias actuales de los consumidores que prefieren consumir alimentos de origen vegetal. La obtención de DAO a partir de vegetales podría ampliar la población objetivo de los suplementos enzimáticos al mismo tiempo que, fomentar prácticas de producción más sostenibles. En este sentido, se están realizando estudios sobre la actividad enzimática de ciertas leguminosas comestibles, como nueva fuente capaz de proporcionar DAO exógena de origen vegetal. (Comas-Basté et al., 2020a). En estudios *in vitro* se ha podido comprobar que extractos de DAO procedente de brotes de guisantes liofilizados eran capaces de degradar histamina de forma eficiente. Actualmente, se están investigando las leguminosas como fuente de obtención de enzima DAO para su uso como ingrediente en la formulación de suplementos de DAO. Dependiendo de la especie de leguminosa se pueden obtener diferentes valores de actividad enzimática, sin embargo, en general, presentan valores de actividad superiores a los de la DAO procedente de riñón de cerdo (Comas-Basté et al., 2020a).

## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### **2.1 Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo es analizar el impacto que tiene la adición de extracto de DAO procedente de guisante, encapsulada y sin encapsular, durante la elaboración de queso de cabra curado sobre el contenido en histamina del queso.

### **2.2 Objetivos específicos**

Con el fin de llevar a cabo el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un proceso de elaboración de queso curado de cabra que permita la adición de diferentes concentraciones de extracto enzimático de DAO procedente de guisante, encapsulada y sin encapsular.
2. Evaluar el contenido en sal, humedad, pH y actividad de agua de los quesos curados de cabra a lo largo del proceso de maduración.
3. Evaluar la efectividad del extracto enzimático de DAO procedente de guisante, encapsulada y sin encapsular, sobre el contenido en histamina de los quesos curados de cabra a lo largo de su maduración.

### **2.3 Plan de trabajo**

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

1. Revisión de estudios previos relacionados con la histamina y los síntomas de la histaminosis, así como, de la acción de la enzima DAO sobre el contenido en histamina.
2. Desarrollo de un proceso de elaboración de queso curado de cabra con DAO de guisante, encapsulada y sin encapsular y elaboración de los quesos.
3. Caracterización de los quesos elaborados, durante el proceso de maduración, en cuanto a su contenido en sal, pH, humedad y contenido en agua.
4. Optimización del método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, para determinar el contenido en histamina en los quesos.
5. Determinación del contenido en histamina por HPLC en los quesos curados, durante el proceso de maduración.
6. Determinación del impacto de la adición de DAO de guisante encapsulada y sin encapsular sobre el contenido en histamina en los quesos de cabra elaborados durante su maduración.
7. Análisis y discusión de resultados.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materia prima

Para el desarrollo de este trabajo, se elaboró queso curado a partir de leche de cabra proporcionada por el Departamento de Ciencia Animal de la UPV.

Con el fin de estudiar el impacto de la enzima diamino oxidasa sobre el contenido en histamina de los quesos, durante el proceso de elaboración se les añadió extracto de DAO obtenida a partir de guisantes germinados (*Pisum Sativum L.*). Esta enzima, fue previamente extraída, liofilizada y encapsulada por otros compañeros del laboratorio y se añadió a los quesos en sus dos formas, liofilizada y encapsulada y, siempre antes de la etapa de prensado. La DAO se añadió con dos ratios diferentes, una más baja [a] de 10 mg DAO/mg histamina y una más alta [b] de 30 mg DAO/mg histamina. Además, también se añadió al queso histamina (100 ppm) con el objetivo de asegurar la presencia del sustrato de la enzima. En definitiva, se elaboraron los siguientes 6 tipos de queso:

-Q: Queso. Este queso se elaboró de la forma habitual, sin adición de ningún componente extra.

-QH: Queso con histamina. Se les añadió 100 ppm de histamina después de la etapa de salado.

-QHDlio [a]: Queso con histamina y con extracto de DAO de guisante liofilizado con una concentración de 10 mg DAO/mg histamina.

- QHDlio [b]: Queso con histamina y con extracto de DAO de guisante liofilizado con una concentración de 30 mg DAO/mg histamina.

- QHDencap [a]: Queso con histamina y con extracto de DAO de guisante encapsulado con una concentración de 10 mg DAO/mg histamina.

- QHDencap [b]: Queso con histamina y con extracto de DAO de guisante encapsulado con una concentración de 30 mg DAO/mg histamina.

#### 3.1.2 Proceso de elaboración de los quesos

Los quesos se elaboraron a partir de 200 L de leche de cabra pasteurizada a 150°C durante 1 s. Una vez elaborados, los quesos se sometieron a una etapa en la que se simuló una maduración de 3 meses. Las etapas del proceso de elaboración fueron las siguientes:

- 1) En primer lugar, se introduce la leche en la cuba hasta que baje su temperatura después de la pasteurización, a 32-33°C. Se añade el fermento láctico mesófilo (1,78 g/100L de leche. Choozit Cheese Cultures Danisco, Francia), necesario para la elaboración de queso curado, y se mide el pH que, debe estar alrededor de 6,6. Se debe de ir midiendo el pH a lo largo del proceso de elaboración de los quesos ya que el fermento irá acidificando la leche y los quesos deben entrar en la cámara de oreo a un pH de 5,3.

- 2) A continuación, se añade cloruro cálcico (0,25 mL/L de leche) a la cuba, se agita y se añade 0,7 mL de cuajo (fuerza 1:10.000) /L de leche. Se mantiene en agitación durante un minuto, aproximadamente, y se deja en reposo para que la leche cuaje, unos treinta minutos.
- 3) Cuando la leche ha cuajado y se ha separado en dos fases, se corta con una lira para facilitar la etapa de desuerado y se mezcla con la lira durante una hora. A continuación, se separa el suero del cuajo. Se aparta un poco de suero para diluir la histamina que, más adelante, se inyectará en los quesos.
- 4) El cuajo se moldea en formato tronchón utilizando telas filtrantes y moldes. Este proceso debe ser rápido ya que se ha de evitar que el pH descienda mucho y que se enfríe el cuajo ya que dificultaría el moldeado de los quesos.
- 5) Después de formar los quesos, se prensan, lo que permite seguir desuerando los quesos para sellar su forma. Se realizan un total de tres prensados. El primero con una duración de 1 h y 30 min y una presión de 1,5 bares. Tras este prensado se inyecta la enzima DAO (liofilizada y encapsulada). El segundo prensado tiene la misma duración que el primero y una presión de 2 bares. Por último, en el tercer prensado, se aplica una presión de 2,5 bares durante 20 min.
- 6) Una vez terminado el prensado, se dejan reposar los quesos hasta que alcancen un pH de 5,4-5,3.
- 7) A continuación, se salan durante 45 min en una salmuera de 20 grados Baumés.
- 8) Se inyecta la histamina en los quesos correspondientes (QH, QHDlio [a], QHDlio [b], QHDencap [a], QHDencap [b]).
- 9) Se introducen los quesos, dentro de los moldes, en la cámara de oreo. Se almacenan durante 24-48h a 8°C y 75% humedad.
- 10) Por último, se introducen los quesos, sin los moldes, en la cámara de maduración a 10-12°C y 80% humedad durante cuatro semanas. Se voltean cada día o cada dos días. Estas condiciones simulan un periodo de maduración de tres meses.



**Figura 3.** Quesos en la cámara de maduración

Las muestras de queso se recogieron al inicio del periodo de maduración (S0) y tras concluir las 4 semanas de maduración (S4) y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Se realizaron dos elaboraciones de cada tipo de queso en diferentes días.

### **3.2 Caracterización de los quesos**

Para estudiar la caracterización de los quesos, se determinó el pH, la actividad de agua, el contenido en sal y la humedad de éstos. Antes de su caracterización, se trituraron todos los quesos utilizando una Thermomix para poder obtener una muestra homogénea. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

#### **3.2.1 Determinación de pH**

Se determinó el pH de los quesos utilizando un pH-metro BASIC 20+ (Crison, Hach Lange Spain, SLU, Barcelona).

#### **3.2.2 Determinación de la actividad de agua**

Para la determinación de la actividad de agua, se hizo uso del equipo WaterLab aw (Steroglass S.r.l., San Martino in Campo, Perugia, IT).

### 3.2.3 Determinación del contenido en sal

Para la determinación del contenido en sal se siguió el procedimiento descrito a continuación:

Primero, se pesaron en tubos Falcon de 50 mL unos 5 g, aproximadamente, de queso triturado. Después, se añadieron 25 mL de agua Mili-Q y se homogenizó la mezcla en el UltraTurrax (IKA Ultraturax T25 Basic, Staufen, DE) durante 1 min a 6000 rpm. A continuación, las muestras se centrifugaron a 8.000 rpm y 20°C durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se filtró para eliminar los sólidos suspendidos. Finalmente, antes de medir la muestra en el equipo, ésta se diluyó a razón de 1:20 (extracto:agua).

El contenido de iones cloruro de esta disolución se determinó empleando un equipo Sherwood Chloride Analyser (Sherwood Scientific Ltd, Cambridge, UK). El funcionamiento de este equipo se basa en una titulación coulométrica, en la que los iones de plata, que se utilizan como reactivo, se generan de manera cuantitativa cuando se aplica una corriente constante entre los electrodos. El punto final de la determinación se da cuando el exceso de los iones de plata produce un cambio en la conductividad, la cual se detecta en los electrodos y nos proporciona un valor numérico.

Para calcular el contenido en sal, se utilizó la siguiente Ecuación [1]

$$SAL (\%) = [Cl] \left( \frac{mg}{L} \right) \times \frac{P_{ms}}{P_{mCl}} \times \frac{V_{1(L)}}{W_{1(mg)}} \times D_1 \times 100$$

Donde:

- $P_{ms}$ : peso molecular de NaCl 58,5 g/mol
- $P_{mCl}$ : peso molecular de Cl 35,5 g/mol
- $V_1$ : volumen de disolución en L. En nuestro caso 0,025 L.
- $W_1$ : peso de la muestra en mg. En nuestro caso 5000 mg.
- $D_1$ : dilución utilizada (20 en nuestro caso)

### 3.2.4 Determinación del contenido en humedad

El procedimiento de determinación del contenido en humedad se realizó siguiendo el método oficial de la AOAC 926.08 (AOAC, 1997). Para ello, se pesaron 3 g de arena, aproximadamente, en un recipiente de metal con una varilla de vidrio que, se dejaron secar en estufa a 100°C durante 2 h y, después de atemperarse, se pesaron ( $W_1$ ). Seguidamente, se añadieron 3 g de queso triturado y se anotó el peso ( $W_2$ ). Se homogenizó la muestra y la arena con ayuda de la varilla de vidrio y se secó en un horno de vacío VACIOTEM-T (J.P. SELECTA, Abrera-Barcelona) a 100 mm Hg (13.3 kPa) de presión y 100°C hasta alcanzar un peso constante. Una vez terminado el secado, se colocaron las muestras en un desecador hasta que se atemperaron y, finalmente, se pesaron ( $W_3$ ).

Para calcular el contenido en humedad se utilizó la Ecuación [2].

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$



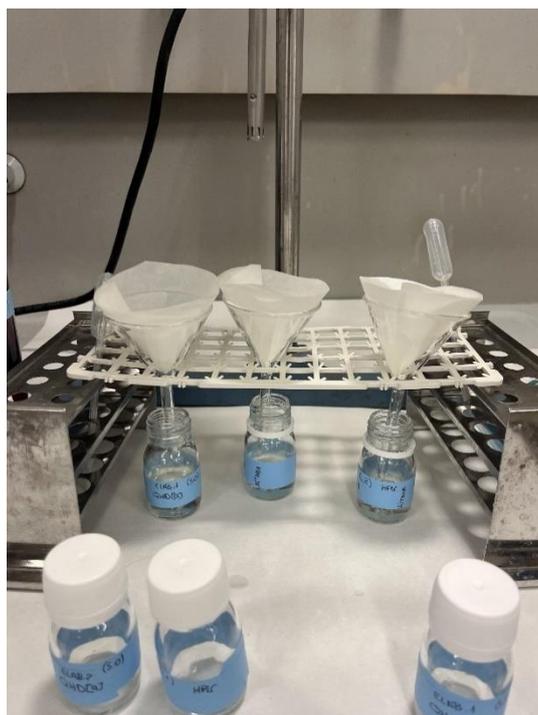
**Figura 4.** Queso homogenizado con la arena después de pasar por la estufa

### 3.3 Determinación del contenido de histamina por HPLC

#### 3.3.1 Obtención del extracto.

Antes de determinar el contenido en histamina de los quesos, fue necesario preparar las muestras (extractos). Para ello, se siguió el protocolo que utilizaron Joosten & Olieman, (1986) y modificado por Botello-Morte et al., (2022).

En primer lugar, se pesaron en un tubo Falcon de 50 mL estéril 5 g de queso triturado. A continuación, se añadieron 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) y se homogenizó la mezcla en el UltraTurrax (IKA Ultraturrax T25 Basic, Staufen, DE) durante 2 min a 4.000 rpm. Una vez homogenizada la muestra, se centrifugó a 10.900 g durante 10 min a 20°C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante con papel de filtro y se congeló a -80°C hasta su derivatización.



*Figura 5. Recuperación del sobrenadante con papel de filtro.*

### **3.3.2 Derivatización**

Para la derivatización de los extractos, se siguió el protocolo de Vinci et al., (2021) con algunas modificaciones, con el fin de optimizar el proceso. Los cambios se vieron reflejados en las condiciones de temperatura y concentración de cloruro de dansilo añadido.

En primer lugar, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de extracto de queso a un tubo Falcon de 15 mL estéril y se ajustó el pH hasta 10-12 con 150  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 N 150  $\mu\text{L}$  de solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Después, se añadieron en oscuridad 500  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de dansilo (14 mg/ml de cloruro de dansilo LiChropur™, con una pureza  $\geq 99.0\%$  en acetona de grado HPLC). Una vez se añadieron estos tres reactivos, se agitaron los tubos con ayuda de un vórtex y se metieron en un baño a 50°C durante 45 min. Después del baño caliente, se atemperaron las muestras en un baño con hielo durante 5 min. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 25% v/v para detener la reacción y, finalmente, se ajustó el volumen de las muestras a 2,5 mL con acetonitrilo de grado HPLC.

### 3.3.3 Determinación del contenido en histamina

Los extractos derivatizados, se filtraron utilizando filtros de jeringa de politetrafluoroetileno de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ . Los análisis cromatográficos se realizaron en un sistema HPLC de la serie LaChrom Elite® (VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvania, EEUU) utilizando una columna cromatográfica de fase inversa C18 Agilent Eclipse XDB-C18 de 150mm  $\times$  4,6 mm de diámetro interno y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula con una pre-columna Agilent Eclipse XDB-C18 de 12,5mm  $\times$  4,6 mm de diámetro interno. La detección se realizó con un detector de UV-vis a 254 nm.



**Figura 6.** Filtración de los extractos derivatizados con filtros de jeringa de politetrafluoroetileno de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$

La fase móvil consistió en agua ultrapura/acetonitrilo (50/50, v/v). El volumen de inyección de la muestra fue de 50  $\mu\text{L}$  y la velocidad de flujo fue de 1,2 mL/min. Para la cuantificación de histamina en las muestras se preparó una recta de calibrado empleando patrones de concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 30 ppm (mg/L). Estas disoluciones patrón se prepararon a partir de una disolución madre de histamina de 30 mg/L, la cual se preparó pesando 2,4840 mg de dihidrocloruro de histamina (Sigma Aldrich) y enrasando con ácido tricloroacético (TCA) hasta 50 mL.



**Figura 7.** *Cromatografo LaChrom Elite® (VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvania, EEUU.)*

### **3.4 Análisis estadístico**

La evaluación estadística de los resultados se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) simple utilizando el programa Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Technologies Inc., EE. UU.). Se hizo uso del método Least Significant Difference (LSD), con un nivel de confianza del 95% ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) para poder identificar las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de los quesos

Los parámetros de caracterización de los quesos estudiados en este trabajo se presentan en la Tabla 2. El análisis de la varianza realizado para estudiar la influencia del tiempo de maduración mostró que, para un mismo tipo de queso, los valores de  $a_w$ , humedad y sal al principio (S0) y final del periodo de maduración (S4) tuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en todos los quesos estudiados. En cuanto a los parámetros  $a_w$  y humedad, los valores al final de la maduración fueron significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) y el contenido en sal aumentó ( $p < 0,05$ ) al final de la maduración. Sin embargo, los valores de pH se mantuvieron estables durante toda la maduración. Por otro lado, si se comparan entre sí los diferentes quesos en el mismo periodo de maduración se pudo observar que no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos, en ninguno de los parámetros estudiados.

**Tabla 2.** Contenido en  $a_w$ , pH, humedad y sal de los quesos: Q, QH, QHDlio [a], QHDlio [b], QHDencap [a] y QHDencap [b].

Muestra	Semana	$a_w$	pH	Humedad (g agua/100g)	Sal (g NaCl/100g)
Q	S0	0,977 <sup>a</sup> ±0,006	5,305 <sup>a</sup> ±0,007	46 <sup>a</sup> ±2	0,7 <sup>a</sup> ±0,2
	S4	0,950 <sup>b</sup> ±0,004	5,268 <sup>a</sup> ±0,003	30,7 <sup>b</sup> ±0,5	1,32 <sup>b</sup> ±0,06
QH	S0	0,975 <sup>a</sup> ±0,002	5,26 <sup>a</sup> ±0,07	46,0 <sup>a</sup> ±0,5	0,9 <sup>a</sup> ±0,02
	S4	0,953 <sup>b</sup> ±0,004	5,22 <sup>a</sup> ±0,02	31,3 <sup>b</sup> ±0,7	1,4 <sup>b</sup> ±0,1
QHDlio [a]	S0	0,973 <sup>a</sup> ±0,002	5,3 <sup>a</sup> ±0,2	45,7 <sup>a</sup> ±0,8	0,8 <sup>a</sup> ±0,2
	S4	0,95 <sup>b</sup> ±0,01	5,28 <sup>a</sup> ±0,07	32,3 <sup>b</sup> ±0,3	1,3 <sup>b</sup> ±0,05
QHDlio [b]	S0	0,973 <sup>a</sup> ±0,003	5,29 <sup>a</sup> ±0,04	47,1 <sup>a</sup> ±0,4	0,7 <sup>a</sup> ±0,2
	S4	0,944 <sup>b</sup> ±0,009	5,31 <sup>a</sup> ±0,01	34 <sup>b</sup> ±1	1,3 <sup>b</sup> ±0,4
QHDencap [a]	S0	0,969 <sup>a</sup> ±0,002	5,28 <sup>a</sup> ±0,08	47,2 <sup>a</sup> ±0,5	0,87 <sup>a</sup> ±0,02
	S4	0,954 <sup>b</sup> ±0,005	5,25 <sup>a</sup> ±0,05	37 <sup>b</sup> ±1	1,29 <sup>b</sup> ±0,02
QHDencap [b]	S0	0,976 <sup>a</sup> ±0,002	5,25 <sup>a</sup> ±0,03	47,4 <sup>a</sup> ±0,5	0,9 <sup>a</sup> ±0,1
	S4	0,958 <sup>b</sup> ±0,002	5,208 <sup>a</sup> ±0,004	34 <sup>b</sup> ±2	1,4 <sup>b</sup> ±0,2

Resultados expresados en media ± desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas para la misma muestra en los distintos tiempos de maduración.

La actividad de agua es un factor importante en la estabilidad de las proteínas. Las protege e impide o retarda su degradación, y por lo tanto favorece el mantenimiento de la actividad enzimática. En todos los quesos estudiados los valores de la aw fueron superiores a 0,9. Una alta aw puede conferir mayor estabilidad a las enzimas, protegiéndolas de la desnaturalización, y aumentar su actividad enzimática (Miyawaki et al., 2016).

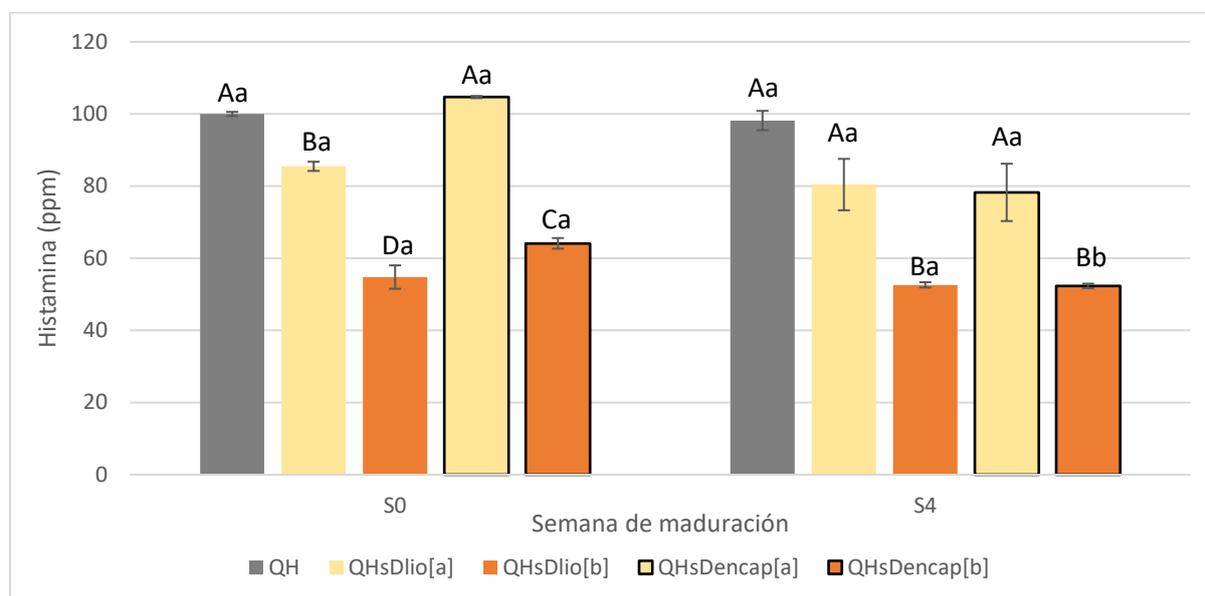
En general, el pH es un factor determinante en la actividad enzimática. La DAO tiene mayor actividad en el rango de pHs 5-7 (Kettner et al., 2022). Todos los quesos estudiados presentaron valores de pH superiores a 5, por lo que se encontraron dentro de este rango.

En cuanto al contenido en humedad, los valores oscilaron entre alrededor de 47 g agua/100 g al principio de la maduración y 30 g agua/100 g al final. Una de las características del proceso de maduración de los quesos es la pérdida de humedad, y el contenido en humedad depende de varios factores, por ejemplo, de la duración del periodo de maduración y de las condiciones en las que tiene lugar este proceso. Por otro lado, es necesario cierto contenido en humedad en el alimento para que se pueda producir la interacción enzima-sustrato.

El contenido en sal de la matriz afecta a la actividad de la diamino oxidasa (DAO). Según Naila et al., (2012), en matrices con concentraciones de sal de hasta un 3%, la actividad de la DAO permitió obtener una importante reducción del contenido en histamina. En los quesos estudiados en este trabajo los valores oscilaron entre 1,63 g NaCl/100g en la semana 4 de maduración y 0,68 g NaCl/100g al principio de la maduración; por tanto, el contenido en sal entra dentro de los límites para un buen funcionamiento de la DAO.

## 4.2 Determinación del contenido en histamina por HPLC

En la Figura 8 se muestran los resultados del contenido en histamina de todos los quesos estudiados en este trabajo, tanto al principio (S0) como al final del periodo de maduración (S4).



**Figura 8.** Contenido en histamina (ppm) de los quesos. S0= principio de la maduración, S4= final de la maduración

Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre quesos para un mismo periodo de maduración. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas para la misma muestra en los distintos tiempos de maduración.

Si se comparan las muestras entre sí al principio de la maduración (S0), puede observarse que independientemente de si la DAO añadida fue liofilizada o encapsulada, los quesos con mayor concentración de DAO [b] mostraron los menores contenidos ( $p < 0,05$ ) en histamina, tal y como era de esperar. Por otro lado, para una misma concentración de DAO, los quesos con DAO liofilizada presentaron un contenido en histamina significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior que los quesos con DAO encapsulada. Concretamente, los quesos formulados con 30 mgDAO/mg histamina presentaron una reducción en los niveles de histamina de hasta un 45% al principio de la maduración.

Al final del periodo de maduración (S4), si se comparan los quesos con diferentes concentraciones de DAO, los formulados con mayor concentración de DAO [b] fueron los que mostraron los menores niveles ( $p < 0,05$ ) de histamina, al igual que sucedió en S0. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), en los niveles de histamina, entre los quesos con DAO liofilizada y encapsulada para la misma concentración de DAO. Los quesos formulados con 30 mgDAO/mg histamina, presentaron una reducción en los niveles de histamina de hasta un 47% al final del periodo de maduración.

Si se comparan cada una de las muestras al principio y al final de la maduración sólo se observaron diferencias significativas para la DAO encapsulada cuando se añadió en la concentración más elevada. Esto podría indicar que la DAO encapsulada mantiene mejor su actividad enzimática que la DAO liofilizada durante el periodo de maduración.

## **5. CONCLUSIONES**

Este trabajo muestra que es posible incorporar DAO liofilizada y encapsulada de forma efectiva en la matriz queso durante el proceso de elaboración de queso curado. Las concentraciones elevadas de DAO (30 mgDAO/mg histamina) permiten disminuir en gran medida el contenido en histamina del queso, pudiendo llegar a reducciones de un 47%. La DAO encapsulada parece ser más estable y presentar mayor actividad que la liofilizada al final del periodo de maduración.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Calzada, J., Del Olmo, A., Picón, A., Gaya, P., & Nuñez, M. (2013). Reducing biogenic-amine-producing bacteria, decarboxylase activity, and biogenic amines in raw milk cheese by high-pressure treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4), 1277-1283.

<https://doi.org/10.1128/AEM.03368-12>

Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2020). 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., & Vidal-Carou, M. del C. (2020). Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*, 10(8), 1181.

<https://doi.org/10.3390/biom10081181>

de A. Møller, C. O., Castro-Mejía, J. L., Krych, L., & Rattray, F. P. (2021). Histamine-forming ability of *Lentilactobacillus parabuchneri* in reduced salt Cheddar cheese. *Food Microbiology*, 98, 103789.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103789>

DeBeer, J., Bell, J. W., Nolte, F., Arcieri, J., & Correa, G. (2021). Histamine Limits by Country: A Survey and Review. *Journal of Food Protection*, 84(9), 1610-1628.

<https://doi.org/10.4315/JFP-21-129>

Díaz García, M. (2012). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias productoras de histamina en queso. <http://hdl.handle.net/10651/4111>

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/10.1111/1750-3841.1506>

Kettner, L., Seitzl, I., & Fischer, L. (2022). Recent advances in the application of microbial diamine oxidases and other histamine-oxidizing enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 232.

<https://doi.org/10.1007/s11274-022-03421-2>

Kovacova-Hanuszkova, E., Buday, T., Gavliakova, S., & Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*, 43(5), 498-506.

<https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.001>

Miyawaki, O., Dozen, M., & Hirota, K. (2016). Cooperative hydration effect causes thermal unfolding of proteins and water activity plays a key role in protein stability in solutions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(2), 203-207.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.01.005>

Moniente, M., García-Gonzalo, D., Ontañón, I., Pagán, R., & Botello-Morte, L. (2021). Histamine accumulation in dairy products: Microbial causes, techniques for the detection of histamine-producing microbiota, and potential solutions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1481-1523.

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12704>

Sánchez-Gamboa, C., Hicks-Pérez, L., Gutiérrez-Méndez, N., Heredia, N., García, S., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). Microbiological Changes during Ripening of Chihuahua Cheese Manufactured with Raw Milk and Its Seasonal Variations. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(9), 153.

<https://doi.org/10.3390/foods7090153>

Stratton, J. E., Hutkins, R. W., & Taylor, S. L. (1991). Copyright© International Association of Milk, Food and. En *Journal of Food Protection* (Vol. 54, Número 6).

Taylor, S. L., & Eitenmiller, R. R. (1986). Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 17(2), 91–128.

<https://doi.org/10.3109/10408448609023767>

Zdolec, N., Bogdanović, T., Severin, K., Dobranić, V., Kazazić, S.P., Grbavac, J., Pleadin, J., Petričević, S., & Kis, M. (2021). Biogenic Amine Content in Retailed Cheese Varieties Produced with Commercial Bacterial or Mold Cultures. *Processes*.

<https://doi.org/10.3390/pr10010010>