



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

Efecto de la temperatura y el pH de almacenamiento sobre  
la actividad de la enzima DAO procedente de guisante.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Ferrer Pérez, Andrea

Tutor/a: Hernando Hernando, María Isabel

Cotutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados

Director/a Experimental: Duch Calabuig, Aitana

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

Título: Efecto de la temperatura y pH de almacenamiento sobre la actividad de la enzima DAO procedente del guisante.

Resumen:

La histaminosis o elevados niveles de histamina en sangre puede provocar trastornos que cursan con cefaleas, problemas digestivos y dolor en los huesos y articulaciones, entre otros. Una de las causas que origina la histaminosis es la acumulación de histamina exógena en el organismo. La histamina es una amina biógena que se genera por la descarboxilación del aminoácido L-histidina, reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). En algunos alimentos, como, por ejemplo, el vino, queso o pescado, el sobrecrecimiento de bacterias con actividad descarboxilasa favorece la degradación de histidina y la formación de histamina. La enzima Diamino Oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6) se localiza, principalmente, en las paredes del intestino y es la encargada de metabolizar la histamina exógena que llega a nuestro organismo a través del consumo de los alimentos. Cuando existe una deficiencia de esta enzima o los niveles de histamina exógena son muy elevados se puede producir una acumulación de histamina en el organismo o histaminosis. Para tratar la histaminosis, se recurre a la suplementación con cápsulas de DAO extraída a partir de riñón de cerdo. Sin embargo, esta enzima presenta una actividad limitada y no cumple con las tendencias actuales de los consumidores que prefieren productos procedentes de origen vegetal. Es por esto que, la investigación focalizada en la obtención de DAO de origen vegetal y de elevada actividad enzimática presenta un gran interés.

El objetivo de este trabajo es analizar el efecto del almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura y pH sobre la actividad de la enzima DAO obtenida a partir de guisante amarillo (*Pisum Sativum L.*) Para ello, el extracto enzimático se almacenará a  $-18^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  y  $23^{\circ}\text{C}$  y a pH 3, pH 5 y pH 7 y se determinará la actividad enzimática específica de las muestras tras una hora, una semana, un mes y dos meses de almacenamiento. Además, estos resultados se compararán con los obtenidos de una enzima comercial de DAO procedente de porcino.

Palabras clave:

Vida útil, intolerancia a la histamina, histaminosis.

Title: Effect of storage temperature and pH on the activity of the DAO enzyme from peas.

Summary:

Histamines or high levels of histamine in the blood can cause disorders that cause headaches, digestive problems and pain in the bones and joints, among others. One of the causes of histaminosis is the accumulation of exogenous histamine in the body. Histamine is a biogenic amine that is generated by the decarboxylation of the amino acid L-histidine, a reaction catalyzed by the enzyme L-histidine decarboxylase (EC.4.1.1.22). In some foods, such as wine, the overgrowth of bacteria with decarboxylase activity favors the degradation of histidine and the formation of histamine. The enzyme Diamine Oxidase (DAO, EC.1.4.3.6) is mainly located in the walls of the intestine and is responsible for metabolizing the exogenous histamine that reaches our body through food consumption. When there is a deficiency of this enzyme or exogenous histamine levels are very high, an accumulation of histamine in the body or histaminosis can occur. To treat histaminosis, supplementation with DAO capsules extracted from pig kidney is used. However, this enzyme has limited activity and does not meet the current trends of consumers who prefer plant-based products. That is why research focused on obtaining DAO of plant origin and high enzymatic activity is of great interest.

The aim of this work is to analyze the effect of different storage temperature and pH conditions on the activity of the DAO enzyme obtained from yellow pea (*Pisum Sativum* L.) To do this, the enzyme extract will be stored at -18°C, 4°C and 23°C and at pH 3, pH 5 and pH 7 and the enzymatic activity of the samples will be determined after one hour, one week, one month and two months of storage.

In addition, the effectiveness of pea DAO in degrading the histamine present in red wine will be analyzed. To do this, pea DAO extract will be added to red wine and the histamine content of the wine will be determined by HPLC.

Keywords: HPLC, shelf life, histamine intolerance, histaminosis, wine.

Títol: Efecte de la temperatura i pH d'emmagatzematge sobre l'activitat de l'enzim DAO procedent del pèsol.

Resum:

La histaminosi o elevats nivells d'histamina en sang pot provocar trastorns que cursen amb cefalees, problemes digestius i dolor en els ossos i articulacions, entre altres. Una de les causes que origina histaminosis és l'acumulació d'histamina exògena en l'organisme. La histamina és una amina biògena que es genera per la descarboxilació de l'aminoàcid L-histidina, reacció catalitzada per l'enzim L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). En alguns aliments, com, per exemple, el vi, el sobrecreixement de bacteris amb activitat descarboxilasa afavorix la degradació d'histidina i la formació d'histamina. L'enzim Diamino Oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6) es localitza, principalment, en les parets de l'intestí i és l'encarregada de metabolitzar la histamina exògena que arriba al nostre organisme a través del consum d'aliments. Quan existix una deficiència d'este enzim o els nivells d'histamina exògena són molt elevats es pot produir una acumulació d'histamina en l'organisme o histaminosi. Per a tractar la histaminosi, es recorre a la suplementació amb càpsules de DAO extreta a partir de renyó de porc. No obstant això, este enzim presenta una activitat limitada i no complix amb les tendències actuals dels consumidors que preferixen productes procedents d'origen vegetal. És per això que, la investigació focalitzada en l'obtenció de DAO d'origen vegetal i d'elevada activitat enzimàtica presenta un gran interès.

L'objectiu d'este treball és analitzar l'efecte de diferents condicions de temperatura i pH d'emmagatzematge sobre l'activitat de l'enzim DAO obtinguda a partir de pèsol groc (*Pisum Sativum* L.) Per a això, l'extracte enzimàtic s'emmagatzemarà a -18 °C, 4 °C i 23 °C i a pH 3, pH 5 i pH 7 i es determinarà l'activitat enzimàtica de les mostres després d'una hora, una setmana, un mes i dos mesos d'emmagatzematge.

A més, s'analitzarà l'eficàcia que té la DAO de pèsol per a degradar la histamina present en el vi negre. Per a això, s'afegirà extracte de DAO de pèsol en vi negre i es determinarà el contingut en histamina del vi per HPLC.

Paraules clau: HPLC, vida útil, intolerància a la histamina, histaminosi, vi.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo de fin de máster.

En primer lugar, agradecer a Aitana Duch y a Isabel Hernando, por su orientación y paciencia, así como su apoyo a lo largo de este proyecto. Su experiencia y conocimiento han sido esenciales para el desarrollo de esta investigación.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia y amigos por su apoyo incondicional y comprensión durante no solo este proceso sino por todos estos años. Su paciencia y palabras de aliento han sido esenciales para superar los desafíos y poder finalizar esta etapa de mi vida.

A todos, muchas gracias.

## INDICE:

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 La histamina.....	1
1.2 Histamina en los alimentos .....	2
1.3 La DAO .....	3
1.4 DAO de origen vegetal .....	4
<b>2. Objetivo y plan de trabajo</b> .....	<b>5</b>
2.1 Objetivo general .....	5
2.2 Plan de trabajo.....	5
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>5</b>
3.1 Materia prima .....	5
3.2 Germinación.....	6
3.3 Extracción enzimática.....	6
3.4 Análisis de la estabilidad enzimática de extractos de DAO durante su almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura y pH .....	7
3.4.1 Determinación de la actividad enzimática .....	7
3.4.2 Determinación del contenido en proteína .....	9
3.5 Análisis de la estabilidad enzimática de extractos de DAO durante su almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura y pH .....	10
3.6 Análisis estadístico.....	10
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>11</b>
4.1 Actividad enzimática específica de la DAO .....	11
4.2 Análisis de la estabilidad enzimática de extractos de DAO durante su almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura. ....	11
4.3 Análisis de estabilidad enzimática de extractos de DAO durante su almacenamiento bajo diferentes condiciones de pH .....	13
<b>5. Conclusión</b> .....	<b>15</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>16</b>
<b>7. Anexos</b> .....	<b>20</b>
<b>ANEXO I. Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030</b> .....	<b>20</b>
<b>ANEXO II. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	<b>22</b>

## INDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Reacción enzimática generadora de histamina a partir de histidina ...	1
Figura 2. Guisantes germinados durante 6 días.....	6
Figura 3. Proceso de filtración del extracto enzimático .....	7
Figura 4. Reacción enzimática (Cebrián, 2018).....	8
Figura 5. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre temperatura de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática.....	11
Figura 6. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre tiempo de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática.	12
Figura 7. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre tiempo y temperatura de almacenamiento para el porcentaje de actividad enzimática. .	13
Figura 8. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre pH de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática.	14
Figura 9. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre tiempo y el pH de almacenamiento para el porcentaje de actividad enzimática específica. ....	14
Figura 10. Gráfico de barras de estabilidad térmica (-18°C, 4°C y 23°C) de la DAO de guisante (DAO gui) y DAO de porcino (DAO por) durante su almacenamiento a 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses. ....	22
Figura 11. Gráfico de barras de estabilidad al pH (pH 3, pH 5 y pH 7) de la DAO de guisante (DAO gui) y DAO de porcino (DAO por) durante su almacenamiento a 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses. ....	23

## INDICES DE TABLAS:

Tabla 1. Grado de relación de trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030.....	20
Tabla 2. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de DAO de guisante y de porcino almacenada a diferentes temperaturas (-18°C, 4°C y 23°C) durante 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses. ....	22
Tabla 3. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de DAO de guisante y de porcino almacenada a diferentes pHs (pH 3, pH 5 y pH 7) durante 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses.....	23

# 1. Introducción

## 1.1 La histamina

La histamina es una molécula derivada de un aminoácido esencial, la histidina, y se produce por la descarboxilación catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22).

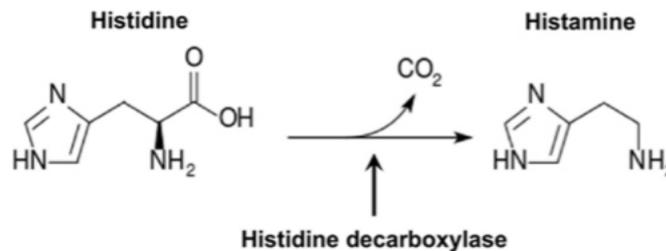


Figura 1. Reacción enzimática generadora de histamina a partir de histidina

La presencia de histamina en el cuerpo humano puede ser de origen endógeno o exógeno.

La histamina endógena es un constituyente natural de los tejidos que se almacena en los mastocitos y basófilos, es un potente mediador de numerosas reacciones biológicas que, ejerce sus efectos vinculándose con sus cuatro receptores [receptor H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>] en las células de destino en distintos tejidos. A continuación, se describe dónde se localizan cada uno de los receptores y qué implica su activación (Montes et al., 2005):

- H<sub>1</sub>: se encuentran en el músculo liso bronquial, intestino y vasos sanguíneos. Su activación produce una contracción del músculo liso bronquial, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, y liberación de mediadores de la inflamación.
- H<sub>2</sub>: se encuentran en las células parietales gástricas, regulando la secreción gástrica. En el sistema inmune, donde activan a eosinófilo y neutrófilos e inhiben la síntesis de linfocitos B, producen relajación del músculo liso y aumento en la producción de moco.
- H<sub>3</sub>: se encuentran en el sistema nervioso central, donde la histamina actúa como neurotransmisor. Regula las respuestas a otros neurotransmisores, como la serotonina o dopamina.
- H<sub>4</sub>: se encuentran en células hemáticas, implicadas en el sistema inmune como mastocitos. En recientes estudios se ha visto que estos receptores tienen un importante papel regulador en la respuesta inmune e inflamatoria, estando implicados en enfermedades autoinmunes.

La histamina exógena, alcanza nuestro organismo a través de la ingesta de los alimentos (International Society of DAO Deficiency, 2024). Esta histamina es

metabolizada por la enzima diamino oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6) en el intestino que, cataliza la desaminación oxidativa del grupo amino primario a imidazol acetaldehído (San Mauro Martin, 2016).

## 1.2 Histamina en los alimentos

La histamina de los alimentos es, en condiciones normales, rápidamente metabolizada por la DAO intestinal y después eliminada a través de la orina. Cuando existe un desequilibrio entre la histamina ingerida y su capacidad de metabolización, se produce su acumulación en el plasma y la aparición de los efectos adversos (Mariné-Font et al., 1995).

Los trastornos o efectos adversos relacionados con la histamina de origen alimentario pueden ser (Ortolani et al, 2006):

- Intoxicación histamínica, asociada al consumo de alimentos con concentraciones inusualmente altas de esta amina, en la que los mecanismos de metabolización resultan insuficientes.
- Intolerancia a la histamina (caracterizada por la ausencia de respuesta IgE específica), que deriva de un inadecuado funcionamiento de los sistemas de detoxificación de la histamina de origen genético, patológico o por bloqueo farmacológico de las enzimas implicadas en la metabolización (DAO, MAO), lo que se traduce en una acumulación excesiva de histamina.

La presencia de histamina y de otras aminas biógenas en cantidades bajas puede ser normal en ciertos alimentos, puesto que son compuestos con importantes acciones fisiológicas y de amplia distribución en tejidos animales y vegetales. Sin embargo, en determinados alimentos, su presencia puede ser cuantitativamente muy importante (Mariné-Font et al., 1995).

La vía mayoritaria para la formación de cantidades elevadas de histamina en alimentos es la descarboxilación, de la histidina, mediada por enzimas bacterianas. En los alimentos frescos, la fracción de aminoácidos libres precursores, generalmente, es poco importante, pero con el deterioro aumenta debido a procesos de proteólisis catalizados por enzimas endógenas o de la flora bacteriana contaminante (Wanke et al., 1993).

Algunos de los alimentos susceptibles de presentar valores altos de histamina son aquellos que se deterioran microbiológicamente con facilidad, como carnes y pescados o alimentos/bebidas elaboradas por fermentación, como vinos y quesos (Lehane et al., 2000).

### 1.3 La DAO

La DAO, es una proteína sintetizada en el túbulo renal proximal, así como en las células epiteliales intestinales y almacenada en el plasma.

Es la principal enzima encargada de la inactivación de la histamina extracelular que proviene de los alimentos y controla el paso al plasma. Además, se ha visto que puede funcionar como una proteína de secreción y ser responsable de la recogida de residuos después de la liberación de la histamina extracelular (Naganuma et al., 2017) y, por tanto, los tejidos que contienen DAO son determinantes en el control sistémico de la biodisponibilidad de la histamina.

Por ello, el papel de la diamino oxidasa es fundamental en la aparición de la sintomatología debido a la histaminosis. El déficit de DAO ocasiona un aumento en el plasma de la histamina y, por tanto, mayores migrañas y sintomatología digestiva (Aquino-Miranda et al., 2012). De forma que, un déficit de DAO es una alteración en el metabolismo de la histamina alimentaria que se da cuando hay poca actividad de la diamino oxidasa.

Los resultados de intolerancia a la histamina proceden de un desequilibrio entre la histamina acumulada y la capacidad para degradarla (Reese et al., 2017; Lehane, 2000). Una actividad de DAO reducida conduce a un deterioro en la degradación de la histamina y el consiguiente exceso histamínico puede causar numerosos síntomas que simulan una reacción alérgica (Lange et al., 2013). También el consumo de ciertos alimentos ricos en histamina que pueden liberar histamina o bloquean la DAO pueden provocar diversos síntomas como dolor de cabeza, congestión nasal u otros trastornos (Aquino-Miranda et al., 2012).

Una forma de lidiar con la intolerancia es evitar o reducir la exposición a la histamina exógena, es decir, abstenerse de consumir los alimentos típicos que contienen histamina. La administración de antihistamínicos (Maintz & Novak, 2007) o la suplementación con DAO también puede ayudar (Yacoub et al., 2018). Las cápsulas de DAO comerciales que se usan para suplementación contienen 4,2 mg de extracto de proteína de riñón de cerdo con un 7% de DAO que equivale a 0,3 mg de DAO, con una actividad enzimática de 10.000 HDU/mL. Con una actividad enzimática mayor a 9.000 HDU/mL, va encaminado a evitar la inactivación de la enzima a nivel gástrico (Laboratorios Stada, 2007). Sin embargo, estos suplementos tienen una baja eficacia, debido a que únicamente son capaces de metabolizar entre un 12-14% de la histamina procedente del alimento (Kettner et al., 2020).

Aunque la suplementación con DAO porcina es la más común, hay otras fuentes a partir de las cuales se puede obtener DAO, como, por ejemplo, a partir de guisantes. De hecho, hay estudios que demuestran que la DAO de guisante es más efectiva para la degradación de histamina que la DAO de origen animal (específicamente la porcina) (Kettner et al., 2020).

Por tanto, existen diferentes tipos de DAO dependiendo de la fuente de extracción, y puede tener origen animal o vegetal.

## 1.4 DAO de origen vegetal

De unos años atrás a la actualidad, la investigación sobre la presencia de histamina en los alimentos ha captado el interés en la comunidad científica debido a su elevado potencial tóxico y su presencia en una extensa variedad de alimentos (Comas-Basté et al., 2020a). Se considera que entorno al 1 % de la población padece de intolerancia a la histamina (Kettner et al., 2020). Como se indicó previamente, los suplementos comerciales que contienen DAO de origen animal presentan una baja eficiencia en la reducción de histamina. Esta limitación junto con las dietas basadas en producto de origen no animal lleva e impulsa a la búsqueda de nuevas fuentes para la obtención de DAO.

La obtención de extractos vegetales con alta actividad enzimática de DAO podría llegar a ser una alternativa factible a los suplementos comerciales de DAO de origen animal. Los extractos vegetales pueden satisfacer las preferencias de una parte de la población, que prefiere consumir alimentos de origen vegetal. En este contexto, las legumbres, dentro de los alimentos vegetales, destacan por su elevada actividad de DAO (Yang et al., 2012).

Científicos como Comas-Basté et al (2020<sup>a</sup>) han estudiado la actividad enzimática de la DAO extraída de legumbres como el guisante (*Pisum sativum* L.), y el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) llegando a obtener resultados alentadores. La producción de DAO comienza a aumentar a partir del tercer día de germinación y puede continuar incrementando hasta el décimo día, momento a partir del cual disminuye significativamente (Gibb, 2014).

Hay ciertos factores que influyen en la germinación de las semillas leguminosas, como son la presencia o falta de luz, la temperatura y la humedad relativa del aire que tiene diversos efectos sobre los brotes y que varía significativamente entre especies y variedades de plantas (Vu et al., 2023). Estos factores también pueden influir en la producción de DAO durante la germinación.

Hay que mencionar que, aunque ya se ha extraído DAO de guisante, aún no se ha determinado de manera concluyente la estabilidad de esta enzima en el contexto de su comercialización. La estabilidad de una enzima es un factor crucial que afecta directamente a su viabilidad y eficacia como producto comercial. La enzima DAO, conocida por su capacidad para degradar la histamina, tiene aplicaciones prometedoras como suplemento dietético, especialmente para aquellas personas con intolerancia a la histamina. Sin embargo, para que la DAO de guisantes sea una alternativa viable frente a la DAO de origen animal, es imperativo realizar estudios exhaustivos sobre su estabilidad bajo condiciones comerciales.

## 2. Objetivo y plan de trabajo

### 2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es analizar la estabilidad de la enzima DAO, obtenida a partir de guisantes, durante el almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura y pH.

### 2.2 Plan de trabajo

Para alcanzar el objetivo planteado se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Revisión de estudios previos sobre: histaminosis, histamina, fuentes de DAO, métodos de extracción enzimática y determinación y análisis de la actividad enzimática de DAO.
2. Germinación del guisante (*Pisum sativum L.*) durante 6 días en oscuridad para favorecer la síntesis de DAO.
3. Extracción enzimática de DAO a partir de los guisantes germinados.
4. Determinación del contenido en proteínas en los extractos de DAO procedentes de guisantes germinados y en DAO comercial procedente de riñón de cerdo.
5. Determinación de la actividad enzimática específica de los extractos de DAO obtenidos a partir de guisantes germinados y DAO comercial procedente de riñón del cerdo.
6. Análisis de la estabilidad de la enzima DAO durante dos meses de almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura y pH.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Materia prima

Para este trabajo de final de Máster, se empleó como materia prima guisante forrajero (*Pisum sativum L.*) que fue facilitado por La Fábrica de Piensos del Departamento de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València. El extracto de DAO obtenido a partir de riñón de cerdo fue adquirido en Sigma-Aldrich.

### 3.2 Germinación

Antes de la germinación, se dejaron los guisantes en remojo durante 12 h. Para ello, se colocaron 40 g de guisantes en un frasco de vidrio con 200 mL de agua destilada y se mantuvieron en la oscuridad. Después de las 12 h de remojo, se eliminó el agua usando un tamiz y los guisantes se distribuyeron uniformemente en un recipiente de vidrio hermético, dentro de la cámara de germinación. Los guisantes se germinaron durante 6 d a 27°C en condiciones de oscuridad para inducir estrés en las semillas y favorecer la síntesis de la enzima DAO (Comas-Basté et al., 2020a). Cada recipiente contenía un crisol con una disolución sobresaturada de NaCl (40 g) y agua destilada (12 mL) para mantener una humedad constante del 80% (Simatos y Multon, 1985).

Al finalizar el período de germinación, las muestras se liofilizaron durante 48 h para eliminar completamente el agua de las legumbres. Posteriormente, se trituraron y tamizaron para obtener un polvo homogéneo. Finalmente, el polvo de guisante obtenido se envasó al vacío y se conservó a -20°C hasta su uso.



*Figura 2. Guisantes germinados durante 6 días*

### 3.3 Extracción enzimática

Antes de la determinación de la actividad enzimática y del contenido en proteína de la DAO, se realizó la extracción enzimática a partir de los polvos de guisantes germinados. Para ello, se pesaron 4 g de polvo en tubos de centrifuga y se añadieron 12 mL de tampón fosfato (pH 6,5) preparado a partir de fosfato diácido de potasio (0,07 M) y fosfato disódico (0,07 M). Después de añadir la muestra y el tampón al tubo de centrifuga, la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 min a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C.

Después de la centrifugación, se recolectó el sobrenadante y se mantuvo a 4°C. Este proceso se repitió un total de tres veces. El sobrenadante obtenido de cada centrifugación se combinó y se enrasó hasta 50 mL con el tampón fosfato preparado. Luego, se filtró el extracto resultante para eliminar los sólidos en suspensión utilizando un filtro de 0,22 µm acoplado a una bomba de vacío (Yang et al., el 2012).



*Figura 3. Proceso de filtración del extracto enzimático*

Finalmente, el extracto se liofilizó y se almacenó -18°C en recipientes opacos hasta su utilización.

### 3.4 Análisis de la estabilidad enzimática de extractos de DAO durante su almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura y pH

La actividad enzimática específica se expresó como U/mg de proteína y se calculó a partir de la determinación de la actividad enzimática (U) y el contenido en proteína de los extractos de DAO.

#### 3.4.1 Determinación de la actividad enzimática

##### Fundamento teórico

La determinación de la actividad de la DAO se basó en reacciones enzimáticas tipo redox. Estas reacciones generan una señal analítica claramente detectable, por un cambio de coloración, debido a la alteración del estado de oxidación de una sustancia específica (DA-67). Este cambio de color se utiliza para cuantificar la cantidad de histamina degradada por la acción de la enzima DAO, permitiendo así establecer una relación directa entre la actividad enzimática y la variación observada en la coloración (Cebrián, 2018).

El colorante empleado (DA-67) es incoloro en su estado reducido y, al oxidarse, adquiere una tonalidad azulada, cuyo valor máximo de absorbancia es detectable en el espectrofotómetro a 668 nm. La reacción enzimática completa,

se descompone en dos reacciones consecutivas que se describen a continuación:

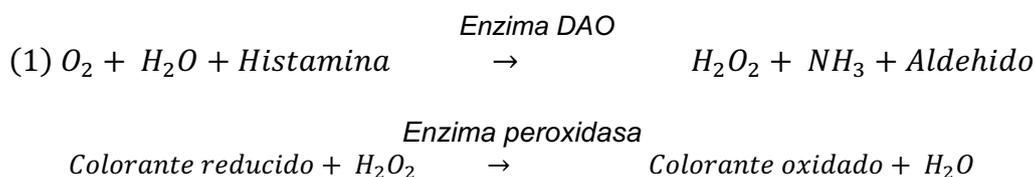


Figura 4. Reacción enzimática (Cebrián, 2018)

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

### Determinación

Para la determinación de la actividad enzimática de la DAO de guisante y de riñón de cerdo, se utilizó el ensayo enzimático colorimétrico con la DA-67 empleando como sustrato, la histamina.

Primero, se introdujo en Eppendorfs de 1,5 mL de capacidad, 726  $\mu$ L de DA-67 (50  $\mu$ M) disuelta en PIPES 25 mM y pH 7,2 y 750  $\mu$ L de una disolución de histamina (1 mM; disuelta en PIPES 25 mM y pH 7,2). Seguidamente se homogenizó la mezcla y se depositó en un baño con agua caliente a una temperatura constante de 37°C durante 10 min (Kettner et al., 2020).

Posteriormente y de forma rápida y eficaz, se agregaron 24  $\mu$ L de peroxidasa (POD) (266 U/mL; disuelta en PIPES 25 mM y pH 7,2) y 50  $\mu$ L del extracto de las muestras obtenidas anteriormente dando lugar al inicio de la reacción. Se repitió el proceso de homogenización y se introdujeron los Eppendorfs en el baño de agua caliente a la misma temperatura y tiempo.

Finalizado este procedimiento, para frenar la reacción se adicionaron 50  $\mu$ L de dimetilditiocarbonato sódico (30mM). A continuación, se centrifugaron los Eppendorfs durante 3 min a 10.000 rpm y 20°C. Al terminar, se midió la absorbancia del sobrenadante a 668 nm en el espectrofotómetro.

Con el fin de prevenir cualquier posible interferencia en la reacción enzimática de las aminas biógenas que, podrían estar presentes en los extractos obtenidos, se preparó una referencia para cada muestra analizada, se sustituyó la disolución de histamina por 750  $\mu$ L de tampón PIPES (25 mM y pH 7,2). Las medidas de absorbancia obtenidas en las referencias se restaron de la medida

de absorbancia obtenida en las muestras para eliminar las posibles reacciones producidas por otros compuestos.

El cálculo de la actividad enzimática se realizó con ayuda de la recta de calibrado. Para su obtención, se elaboraron disoluciones con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) entre 0,5 y 20  $\mu\text{mol/mL}$ . Seguidamente, se realizó el proceso anterior descrito, donde se sustituyó los 750  $\mu\text{L}$  de histamina iniciales por el tampón ácido piperazidina etanosulfónico (PIPES; 25mM) y la muestra por 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de  $H_2O_2$  preparada. Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se representó la concentración de las disoluciones de  $H_2O_2$  frente a la absorbancia.

La actividad enzimática de la diamino oxidasa (DAO) se expresó como unidad de actividad enzimática (U) que se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato (histamina) en un minuto.

### 3.4.2 Determinación del contenido en proteína

Para la determinación del contenido en proteína, se empleó el método de Bradford, una técnica colorimétrica que se fundamenta en la medición de cambios en la absorbancia causados por la interacción de las proteínas de la disolución con el reactivo de Bradford (Bradford, 1976).

Para la elaboración del reactivo colorante o reactivo de Bradford, se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95%. Posteriormente, se añadieron 100 mL de ácido fosfórico al 85% (p/v) y se completó el volumen a 1 L con agua destilada. Esta preparación se realizó en la cámara de extracción y en completa oscuridad. Una vez obtenido el reactivo, se dejó en nevera hasta su uso (Bradford, 1976).

Para determinar el contenido en proteína, se introdujeron 100  $\mu\text{L}$  de extracto de DAO en un tubo de ensayo y se añadieron 5 mL de reactivo de Bradford. Seguidamente, la mezcla se agitó en un vórtex, se dejó reaccionar durante un período de 2 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda 595 nm en el espectrofotómetro. A su vez, se preparó un blanco. En este caso, la muestra fue remplazada por 100  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato pH 6,5, utilizado durante la extracción de la muestra.

El cálculo del contenido en proteína se realizó con ayuda de la recta de calibrado. Para su obtención, se elaboraron disoluciones con diferentes concentraciones de proteína albúmina de suero bovina (BSA) entre 0 y 10 mg/mL. El procedimiento de reacción fue igual al de las muestras. Una vez obtenidos los resultados de absorbancia, se pasó a representar los valores en una gráfica frente a la concentración de las disoluciones de BSA (Bradford, 1976).

### 3.5 Análisis de la estabilidad enzimática de extractos de DAO durante su almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura y pH

Con el objetivo de determinar la estabilidad durante el almacenamiento de la enzima DAO, la enzima DAO de guisante, anteriormente extraída, y la DAO de porcino, adquirida en Sigma-Aldrich, se almacenaron a diferentes temperaturas:  $-18^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  y  $23^{\circ}\text{C}$  (en una disolución tampón con un pH 7) y a diferentes pH: 3, 5 y 7 (a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ ).

Las muestras se prepararon pesando 20 mg de extracto de DAO liofilizado en un tubo Eppendorf y se diluyeron con 1 mL de disolución tampón. Los tampones se prepararon a partir de una disolución de ácido cítrico 0,1 M y fosfato disódico 0,2 M, ajustando los volúmenes según el pH requerido. Además, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de azida sódica (0,01 g/ml) para evitar la aparición de moho durante el almacenamiento.

La actividad enzimática específica de las muestras se determinó a la hora, a los siete días, al mes y a los dos meses de almacenamiento. Para estudiar el efecto de los factores implicados en la estabilidad se tomó como parámetro de medida el porcentaje de actividad enzimática. Para ello, a la actividad enzimática específica inicial (de cada uno de los extractos enzimáticos) se le dio el valor del 100%.

### 3.6 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa Statgraphics Centurion XVIII. Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para evaluar la actividad enzimática específica de la DAO, de guisante y de porcino, almacenada bajo diferentes condiciones de temperatura y pH. Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, se empleó el método HSD de Tukey (Honestly-Significant-Difference) con un nivel de confianza del 95% ( $p\text{-valor} < 0,05$ ).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Actividad enzimática específica de la DAO

La actividad enzimática específica de la DAO procedente de los guisantes germinados fue de 0,102 U/mg de proteína mientras que la de la DAO procedente de riñón de cerdo (comercial) fue de 0,042 U/mg de proteína. La actividad de la DAO vegetal procedente de guisante fue un 143% mayor que la comercial.

### 4.2 Análisis de la estabilidad enzimática de extractos de DAO durante su almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura.

#### Estabilidad térmica

Los resultados del ANOVA multifactorial indicaron que sí hubo interacciones entre los factores temperatura, tiempo de almacenamiento y fuente de DAO (guisante o porcino) para el parámetro porcentaje de actividad enzimática de la DAO y los tres factores fueron significativos.

En la Figura 5, se muestra el gráfico de interacciones entre los factores temperatura de almacenamiento y fuente de DAO utilizada para el parámetro porcentaje de actividad enzimática de la DAO.

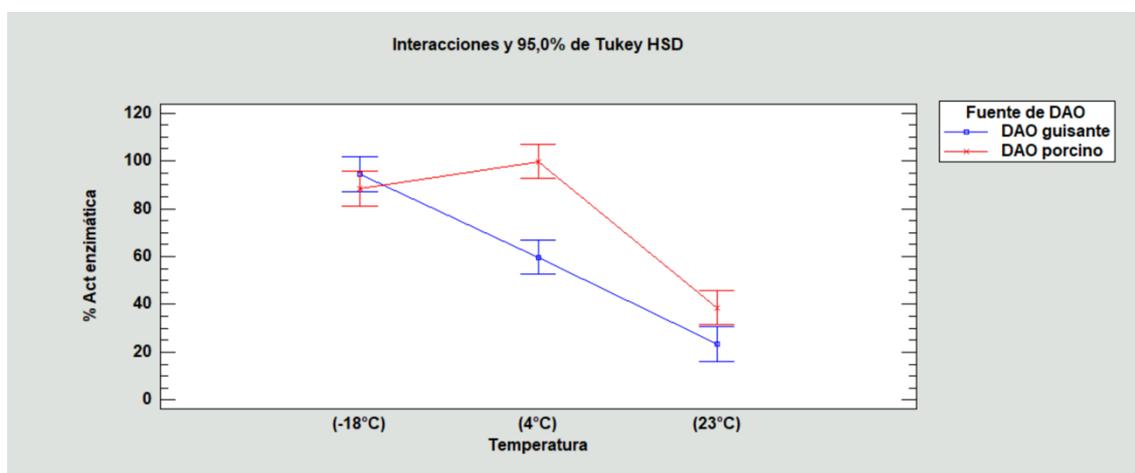


Figura 5. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre temperatura de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática.

Tal y como se puede apreciar en la figura 5 la estabilidad de la DAO de guisante disminuyó con el aumento de la temperatura. A temperaturas de almacenamiento de -18°C, la DAO de guisante presentó una elevada estabilidad, ya que, mantuvo por completo su actividad enzimática específica. A 4°C mantuvo alrededor del 60% de su actividad enzimática inicial y a temperaturas de almacenamiento de 23°C, alrededor del 30% de su actividad.

Por otro lado, la DAO de porcino presentó altos niveles de estabilidad (100% de su actividad enzimática específica inicial) tanto a temperaturas de almacenamiento de  $-18^{\circ}\text{C}$  como a  $4^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, a  $23^{\circ}\text{C}$  mostró alrededor del 45% de su actividad enzimática específica inicial.

En general, la DAO comercial, procedente de porcino, presentó una mayor estabilidad a la temperatura en comparación con la DAO de guisante. La DAO comercial es un preparado con excipientes y compuestos que pueden presentar propiedades conservantes y preservar su actividad.

La Figura 6, muestra la interacción entre los factores tiempo de almacenamiento y fuente de DAO utilizada para el parámetro porcentaje de actividad enzimática de la DAO.

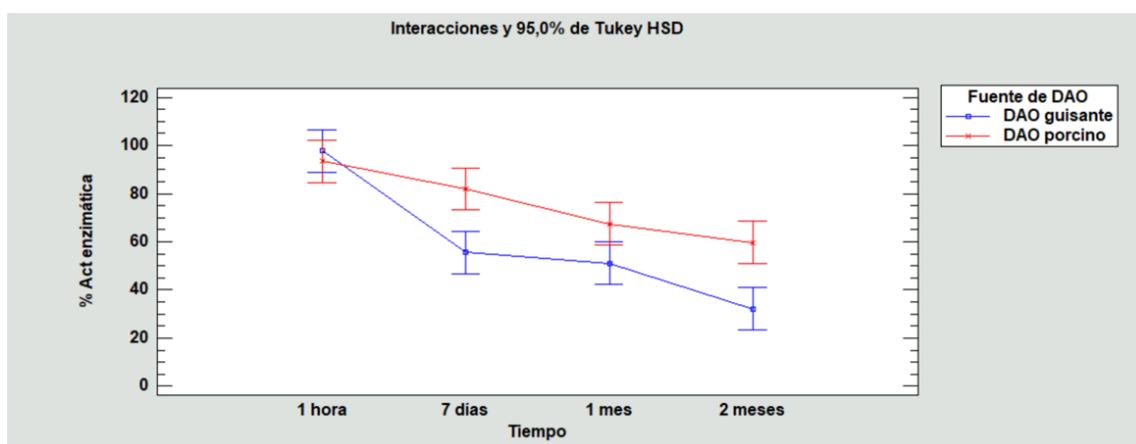


Figura 6. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre tiempo de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática.

Como se puede apreciar (Figura 6) tanto la DAO de guisante como la de porcino presentaron una alta estabilidad (100% de su actividad enzimática específica inicial) tras 1 h de almacenamiento. La DAO de porcino presentó valores más estables de actividad enzimática durante los 2 meses de almacenamiento que la DAO de guisante. La DAO de guisante a los 7 d de almacenamiento mostró alrededor del 60% de la actividad enzimática específica inicial, sin embargo, a partir de ese día y hasta los 2 meses de almacenamiento la actividad se mantuvo estable, sin encontrarse diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los valores de porcentaje de actividad. Tras 1 mes de almacenamiento no se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en el descenso de porcentaje de actividad enzimática entre las dos enzimas. En general, la estabilidad de la DAO de porcino al tiempo de almacenamiento fue mayor que la de la DAO de guisante.

En la Figura 7, se presenta el gráfico de interacciones entre los factores tiempo y temperatura de almacenamiento para el parámetro porcentaje de actividad enzimática de la DAO.

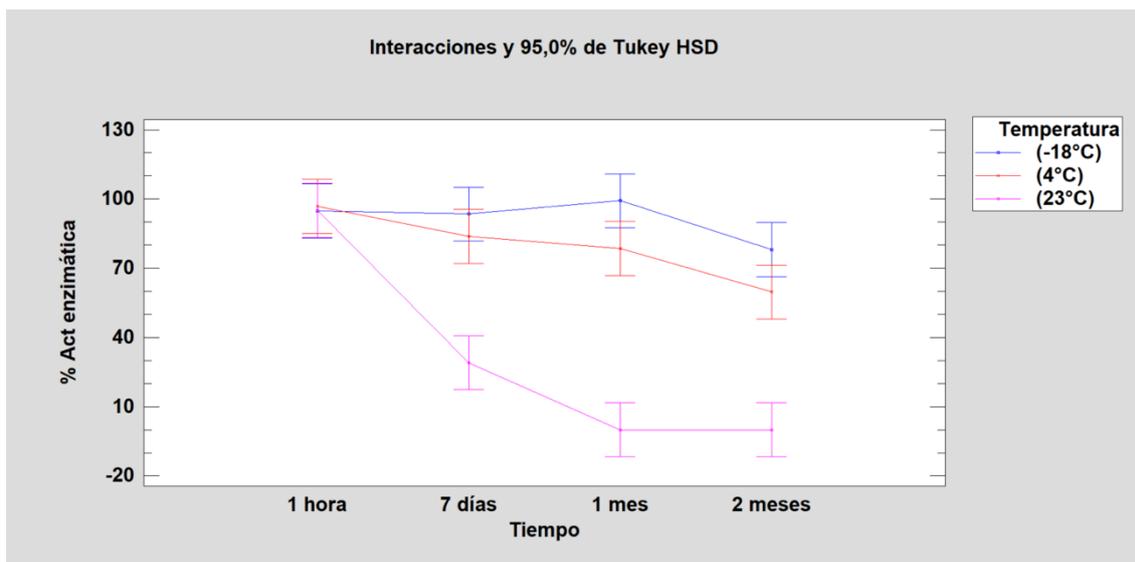


Figura 7. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre tiempo y temperatura de almacenamiento para el porcentaje de actividad enzimática.

Como se puede apreciar (Figura 7), después de una hora de almacenamiento, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los valores de actividad enzimática específica con respecto a la inicial de la DAO para ninguna de las diferentes temperaturas de almacenamiento. Por tanto, a corto plazo (1 hora), independientemente de la temperatura de almacenamiento, la actividad enzimática específica se mantuvo estable. Cuando la temperatura de almacenamiento fue de  $-18^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  la actividad de la DAO se mantuvo estable durante todo el periodo de almacenamiento y los valores de porcentaje de actividad no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre sí. El almacenamiento a  $23^{\circ}\text{C}$  durante 1 h mantuvo estable la actividad de la DAO, sin embargo, tras 7 d de almacenamiento la estabilidad de la DAO disminuyó, mostrando valores de porcentaje de actividad de alrededor del 30% de su actividad inicial. Esta actividad se mantuvo estable tras un mes y hasta el final del periodo de almacenamiento.

#### 4.3 Análisis de estabilidad enzimática de extractos de DAO durante su almacenamiento bajo diferentes condiciones de pH

##### Estabilidad al pH

Los resultados del ANOVA multifactorial indicaron que sí hubo interacción entre los factores pH y tiempo de almacenamiento, y pH y fuente de DAO (guisante o porcino) para el porcentaje de actividad enzimática de la DAO, siendo significativos los tres factores.

La Figura 8, muestra el gráfico de interacción entre el pH de almacenamiento y la fuente de DAO utilizada para el parámetro porcentaje de actividad enzimática de la DAO.

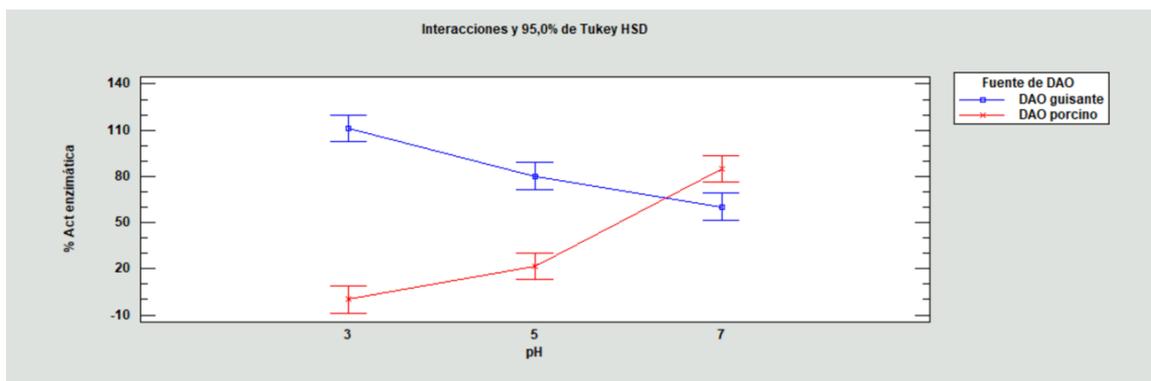


Figura 8. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre pH de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática.

Como se puede observar (Figura 8), la estabilidad enzimática de la DAO bajo diferentes pHs de almacenamiento mostró una tendencia totalmente opuesta según la fuente de DAO empleada. La estabilidad de la DAO de guisante disminuyó al aumentar los valores de pH mientras que la estabilidad de la DAO de porcino aumentó al aumentar el pH. A pH 3, la DAO de guisante mostró elevada estabilidad (100% de su actividad enzimática específica inicial), sin embargo, la DAO de porcino perdió toda la actividad a este pH. A pH 5 la estabilidad de la DAO de guisante fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a la de la DAO de porcino. A pH 7 tanto la DAO de guisante como la de porcino mantuvieron altos niveles de estabilidad, con porcentajes de actividad enzimática cercanos al 80% y al 90% de su actividad enzimática específica inicial, respectivamente. En general, se observó una mayor estabilidad al pH en la DAO de guisante que en la DAO de porcino.

En la Figura 9, se muestra el gráfico de interacción entre el tiempo de almacenamiento y pH para el parámetro porcentaje de actividad enzimática de la DAO.

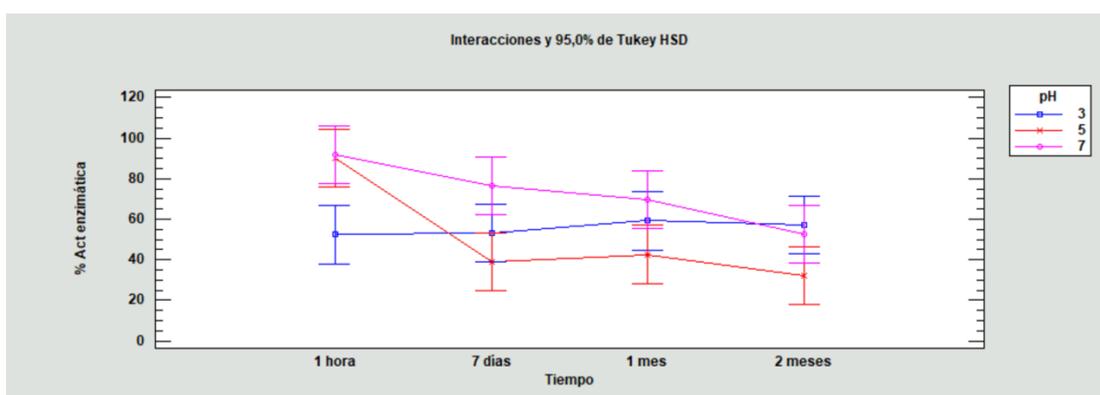


Figura 9. Gráfico de medias e interacciones con intervalos HSD entre tiempo y el pH de almacenamiento para el porcentaje de actividad enzimática específica.

Como se puede apreciar (Figura 9) las muestras de DAO almacenadas durante 1 h a pH 5 y 7 mantuvieron el 100% de su actividad enzimática específica inicial, sin embargo, a pH 3 sólo mantuvieron el 50% de su actividad. Las muestras almacenadas durante 7 d fueron más estables a pH 7, sin embargo, no se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) en el porcentaje de actividad entre las muestras almacenadas durante 1 y 2 m para ninguno de los pHs estudiados.

## 5. Conclusión

La DAO procedente de guisante presenta una actividad enzimática específica 2,4 veces superior a la de la DAO comercial procedente de riñón de cerdo.

En general, la actividad enzimática de la DAO de guisante y porcino muestran una tendencia decreciente al aumentar la temperatura de almacenamiento; esta tendencia se va haciendo más acusada al aumentar el tiempo de almacenamiento. A  $-18^{\circ}\text{C}$ , ambas fuentes de DAO presentan una actividad enzimática elevada, cercana al 100% de su actividad específica inicial. A  $4^{\circ}\text{C}$  la actividad de la DAO de porcino permanece estable y la DAO de guisante mantiene el 60% de su actividad específica inicial. El almacenamiento a  $23^{\circ}\text{C}$  produce un descenso de la actividad enzimática de las dos enzimas.

A pH 7, la actividad enzimática de la DAO procedente de ambas fuentes (guisante y porcino) es elevada, y se mantiene estable a lo largo del tiempo. El almacenamiento a pH 5 mantiene altos niveles de actividad en la DAO de guisante, pero no, en la DAO porcina. El almacenamiento a pH 3 permite que la DAO de guisante mantenga el 100% de su actividad enzimática específica inicial, sin embargo, a este pH la DAO de porcino pierde toda su actividad.

La DAO procedente de guisante es una alternativa eficaz y sostenible para el desarrollo de suplementos de DAO de origen vegetal orientada a todo tipo de consumidores, incluidos vegetarianos y veganos. También podría utilizarse para la elaboración de alimentos, ya que, es estable a diferentes pHs.

Se requiere seguir estudiando diferentes formas de proteger la enzima de entornos desfavorables y así poder mejorar su estabilidad para aprovechar en su totalidad el potencial de la DAO del guisante para reducir el contenido de histamina y sus efectos negativos en el ser humano.

## 6. Bibliografía

1. Aquino-Miranda et al. Regulación por receptores H<sub>3</sub> a histamina de la liberación de neurotransmisores en los ganglios basales: implicaciones para la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. *Gac Méd Méx.* 2012; 148:467-65.
2. Bieganski T, Kusche J, Lorenz W, Hesterberg R, Stahlknecht CD, Feussner KD. Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. *Biochim Biophys Acta* 1983;756:196–203.
3. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
4. Cebrián Aznárez, P. A., Javier Galbán Bernal, y Isabel Sanz Vicente. Desarrollo de test enzimático para la determinación de aminas biógenas. Universidad de Zaragoza, 2019. <https://zaguan.unizar.es/record/86539?ln=es>
5. CHANG, S.; AYRES, J.; SANDINE, W. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophane *J. Dairy Sci.* 68(11): 2840–2846. 1985.
6. Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M. T., y Vidal-Carou, M. C. Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance. *LWT*, 125, 109201, 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109201>
7. Contreras, Mary, Izquierdo, Pedro, Allara, María, García, Aiza, Torres, Gabriel, & Céspedes, Euclimar. (2007). Determinación de aminas biógenas en quesos madurados. *Revista Científica*, 17(1), 89-95. Recuperado en 07 de mayo de 2024. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592007000100014&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592007000100014&lng=es&tlng=es)
8. Diaz M, Ladero V, Redruello B, Sanchez-Llana E, del Rio B, Fernandez M, et al. A PCR-DGGE method for the identification of histamineproducing bacteria in cheese. *Food Control*. 2016;63:216–23.
9. *Farmacología básica y clínica* 12 edición. Lange, Bertram G, Katzung, MD, PhD. Cap 16, 273-77. 2013.
10. García-Moruno, E. and Muñoz, R. Does *Oenococcus oeni* produce histamine *International Journal of Food Microbiology*. 157, 121-129. 2012.

11. Gibb, J. Fuentes naturales de DAO, 2014.  
<https://www.low-histamine.com/tag/pea-sprouts/>
12. Giuliana Vinci, Donatella Restuccia, Ricarda Antiochina. Dipartimento di Management Università di Roma “La Sapienza”. Determination of biogenic amines in wines by HPLC- UV and LC-ESI-MS,2021.
13. International society of DAO deficiency, 2024. <https://www.deficitdao.org/el-deficit-de-dao/origen-de-deficit/>
14. Kettner, L., Seitzl, I., y Fischer, L. Evaluation of porcine diamine oxidase for the conversion of histamine in food-relevant amounts. Journal of Food Science, 85(3), 843-852, 2020.<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15069>
15. Kleberg, F. Envenenamiento por histamina asociado a la ingestión de alimentos. Ingeniería Industrial, 7(007), 41- 44,1993.  
<https://doi.org/10.26439/ing.ind1993.n007.3065>
16. Klocker J, Matzler SA, Huetz GN, Drasche A, Kolbitsch C, Schwelberger HG. Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. Inflamm Res 2005;54(Suppl 1):S54–S57.
17. Kusche J, Bieganski T, Hesterberg R, et al. The influence of carcinoma growth on diamine oxidase activity in human gastrointestinal tract. Agents Actions 1980;10:110–3.
18. Laboratorios Stada, 2007.
19. Landete, J.M.; Ferrer, S.; Polo, L. and Pardo, I. Influencia de factores físico-químicos del vino sobre la producción de histamina. Tecnología del vino. 19, 67-70. 2004.
20. Landete, J.M.; de las Rivas, B.; Marcobal, A. and Munoz, R. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. International Journal of Food Microbiology. 117, 258-269. 2007.
21. Lehane L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited. Int J Food Microbiol. 2000;58:1-37.
22. Maintz, L. y Novak, N. Histamina e intolerancia a la histamina. Revista estadounidense de nutrición clínica , 85 , 1185-1196, 2007.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>
23. Mariné-Font A, Vidal-Carou MC, Izquierdo-Pulido ML, VecianaNogués MT, Hernández-Jover T. Les amines biogenes dans les aliments: leur signification, leur analyse. Ann Fals Exp Chem. 1995;931:119-40.

24. Montes J, Flores J, Alfonso Barrón E. Histamina, receptores y antagonistas. *Revista Médica del Hospital de México*, SS. Vol. 68, Núm. 3 Jul-Sep. 2005 pp 164-169.
25. Naganuma, F et al. Histamine N-methyltransferase regulates aggression and the sleep-wake cycle. *Scientific Reports*, 2017. Nov. 715899.
26. NOVELLA, S.; VECIANA, M.; ROIG, A.; TRUJILLO, A.; VIDAL, M. Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 85(10): 2471-2478. 2002.
27. Ortolani C, Pastorello EA. Food allergies and food intolerances. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006;20:467-83.
28. Raithel M, Ulrich P, Hochberger J, Hahn EG. Measurement of gut diamine oxidase activity. Diamine oxidase as a new biologic marker of colorectal proliferation? *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:262–6. 25.
29. Reese I, Ballmer-Weber B, Beyer K, et al. German guideline for the management of adverse reactions to ingested histamine. *Allergo Journal International.* 2017; 26 (2): 72-79.
30. San Mauro Martin, S. Brachero, E. Garicano Vilar, Histamine intolerance and dietary management: A complete review, *Allergologia et Immunopathologia*, Volume 44, Issue 5, 2016.
31. Schwelberger HG, Bodner E. Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochim Biophys Acta* 1997;1340:152–164.
32. Schwelberger HG. Diamine oxidase (DAO) enzyme and gene. In: Falus A (ed). *Histamine: Biology and Medical Aspects*. Budapest: Springer Med Publishing, 2004, 43–52.
33. Scott R. *Fabricación de Quesos*. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza España. 520 pp. 1991.
34. Simatos, D., y Multon, J. L. (Eds.). *Properties of Water in Foods*. Springer Netherlands, 1985.
35. Takagi, K., Nakao, M., Ogura, Y., Nabeshima, T., y Kunii, A. Sensitive colorimetric assay of serum diamine oxidase. *Clinica Chimica Acta*, 226(1), 67-75, 1994. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(94)90103-1)
36. Taylor SL. Histamine fish poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit Rev Toxicol.* 1986;17:91-128.
37. VEISSEYRE, R. *Lactología Técnica. Recogida, tratamiento y transformación de la leche en países templados y calientes. Primera Parte. Capítulo I.*

Caracteres, Composición y Estructura de la Leche. Capítulo IX. Técnicas Queseras. Editorial Acribia. Zaragoza España. 643 pp. 1972.

38. Vu, T. A., Kha, C. T., y Phan, T. H. The changes in Gamma-aminobutyric acid and polyphenols in mung beans (*Vigna radiata* L.) during germination. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1155(1), 012024, 2023. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1155/1/012024>
39. Wanke F, Götz M, Jarisch R. Histamine-free diet: treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches. Clin Exp Allergy. 1993;23:982-5.
40. Yacoub, M.-R. , Ramírez, GA , Berti, A. , Mercurio, G. , Breda, D. , Saporiti, N. , ... Colombo, G. "Suplementación con diaminooxidasa en la urticaria crónica espontánea: un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo" . Archivos Internacionales de Alergia e Inmunología , 176 , 268 – 271, 2018.
41. Yang, R., Chen, H., Han, Y., y Gu, Z. Purification of diamine oxidase and its properties in germinated fava bean (*Vicia faba* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(8), 1709-1715, 2012.

## 7. Anexos

### ANEXO I. Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030

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

*Tabla 1. Grado de relación de trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030.*

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

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

ODS 3- Salud y bienestar.

Al desarrollar una alternativa al actual tratamiento para la intolerancia a la histamina, que es más eficiente metabolizando la histamina y más sostenible, ya que está elaborada a partir de enzima diamino oxidasa de guisante. La DAO de origen vegetal podrá satisfacer las exigencias de un sector más amplio de la población al alinearse con las exigencias de la población vegana y vegetariana.

## ODS 9- Industria, Innovación e Infraestructuras

El tratamiento para la intolerancia a la histamina mediante el uso de DAO vegetal promueve la innovación, así como la investigación y seguir la búsqueda de nuevas alternativas más sostenibles y eficientes.

## ODS 12- Producción y consumo responsable

Gracias a uso de la fuente vegetal como materia prima para el tratamiento de la intolerancia a la histamina al contrario la alternativa actual que es a base de riñón de cerdo, esta última contribuye al cambio climático, ya que la industria cárnica emite el 14,5% de las emisiones globales de gases de efecto invernadero.

## ODS 15- Vida de ecosistemas terrestres

Al utilizar materia prima de origen vegetal, al contrario de la alternativa actual, elaborada a base de riñón de cerdo. De forma que a utilizar materia prima de origen vegetal contribuimos a la mejora de los suelos y la fijación de nitrógeno, lo cual es beneficioso para la agricultura sostenible, a diferencia de utilizar fuente animal, ya que se destina un 66% de las tierras cultivadas en España a la alimentación animal. +

En conclusión, el desarrollo de un tratamiento para la intolerancia a la histamina a base de enzima de diamino oxidasa extraída de guisantes contribuye a lograr varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecido por la ONU, creando así alternativas más eficiente, sostenibles y fomentando la innovación.

## ANEXO II. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 2. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de DAO de guisante y de porcino almacenada a diferentes temperaturas (-18°C, 4°C y 23°C) durante 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses.

	Tiempo de almacenamiento	Actividad enzimática específica (U/mg de proteína)		
		-18°C	4°C	23°C
DAO de guisante	1 hora	0,101 ± 0,005	0,102 ± 0,003	0,095 <sup>a</sup> ± 0,003
	7 días	0,101 ± 0,006	0,069 ± 0,007	0
	1 mes	0,103 ± 0,003	0,052 ± 0,001	0
	2 meses	0,078 ± 0,003	0,02 ± 0,0004	0
DAO de porcino	1 hora	0,038 ± 0,002	0,04 ± 0,001	0,04 ± 0,0009
	7 días	0,037 ± 0,0007	0,042 ± 0,0008	0,024 ± 0,0009
	1 mes	0,04 ± 0,004	0,044 ± 0,0005	0
	2 meses	0,033 ± 0,002	0,042 ± 0,002	0

A continuación, se muestran los gráficos de barras que reflejan los porcentajes de actividad enzimática obtenidos, a lo largo del tiempo, según la fuente de DAO utilizada, para su almacenamiento a diferentes temperaturas y pHs.

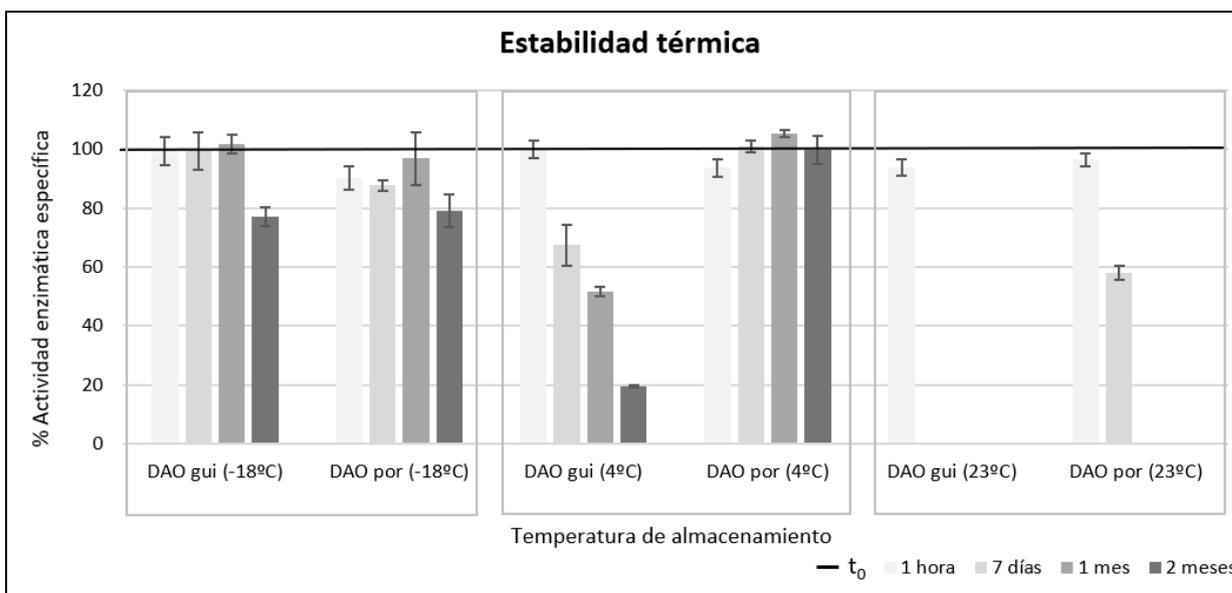


Figura 10. Gráfico de barras de estabilidad térmica (-18°C, 4°C y 23°C) de la DAO de guisante (DAO gui) y DAO de porcino (DAO por) durante su almacenamiento a 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses.

Tabla 3. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de DAO de guisante y de porcino almacenada a diferentes pHs (pH 3, pH 5 y pH 7) durante 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses.

	Tiempo de almacenamiento	Actividad enzimática específica (U/mg de proteína)		
		pH 3	pH 5	pH 7
DAO de guisante	1 hora	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,002	0,11 ± 0,003
	7 días	0,094 ± 0,001	0,092 ± 0,007	0,075 ± 0,008
	1 mes	0,1a ± 0,02	0,101a ± 0,009	0,058c ± 0,002
	2 meses	0,1016 ± 0,0007	0,076 ± 0,009	0,025 ± 0,005
DAO de porcino	1 hora	0	0,02 ± 0,001	0,046 ± 0,001
	7 días	0	0	0,047 ± 0,002
	1 mes	0	0	0,048 ± 0,0006
	2 meses	0	0	0,046 ± 0,003

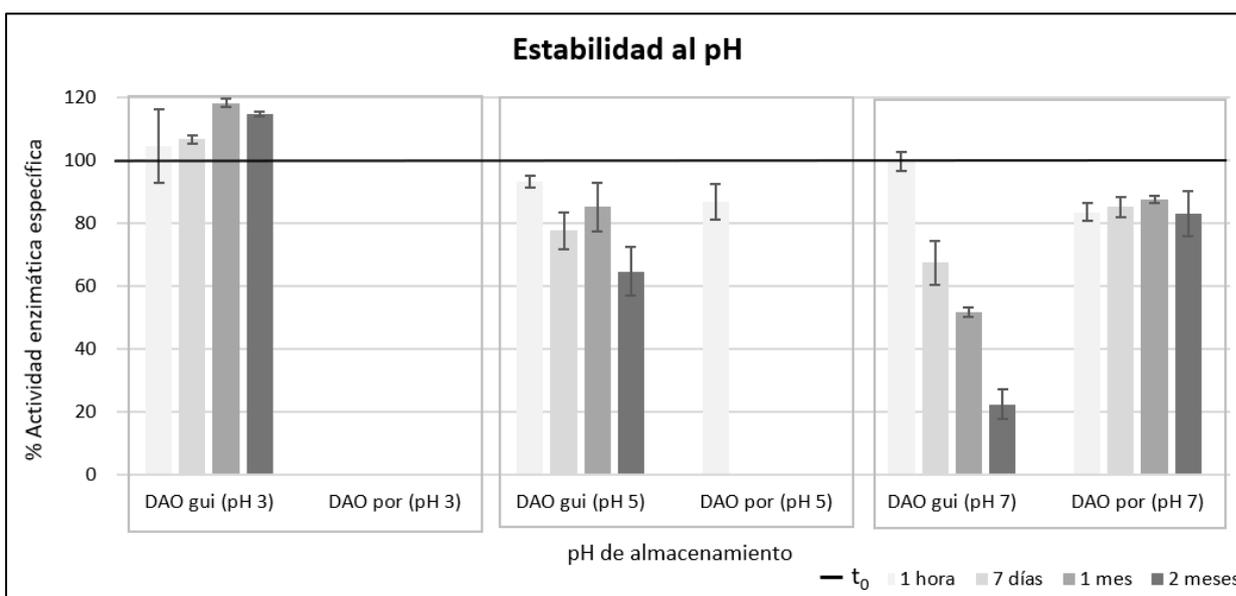


Figura 11. Gráfico de barras de estabilidad al pH (pH 3, pH 5 y pH 7) de la DAO de guisante (DAO gui) y DAO de porcino (DAO por) durante su almacenamiento a 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses.