



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agrònoma i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Agronómica y del Medio Natural

Encapsulación de DAO de guisante y análisis de su  
estabilidad enzimática durante su almacenamiento a  
diferentes condiciones de temperatura y pH

Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Salvi Montañana, María

Tutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados

Cotutor/a: Hernando Hernando, María Isabel

Director/a Experimental: Duch Calabuig, Aitana

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

**Título:** Encapsulación de DAO de guisante y análisis de su estabilidad enzimática durante su almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura y pH.

**Resumen:**

La histamina es una amina biógena, producto de la descarboxilación del aminoácido L-histidina, reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). En el ser humano, esta amina está involucrada en la respuesta inflamatoria, en la vasodilatación, en diversas funciones fisiológicas y actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central. Sin embargo, la acumulación de elevados niveles de histamina en sangre o histaminosis, puede producir trastornos como cefaleas, hinchazón abdominal e hipotensión, entre otros. Algunos alimentos fermentados y/o curados suelen tener un sobrecrecimiento de bacterias con actividad descarboxilasa que favorece la formación de histamina. El consumo de estos alimentos aumenta los niveles de histamina exógena en nuestro organismo. Cuando en nuestro organismo hay una elevada acumulación de histamina exógena o existe un déficit de la enzima Diamino Oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6), enzima encargada de metabolizar la histamina exógena durante la digestión, se puede producir histaminosis. En la actualidad, existen suplementos de DAO obtenidos a partir de riñón de cerdo que se utilizan para reducir los síntomas provocados por la histaminosis; sin embargo, tienen una capacidad de degradación muy baja. Sería interesante estudiar otras fuentes de DAO de mayor efectividad y que sean capaces de degradar la histamina formada en los alimentos.

El objetivo de este trabajo es obtener enzima DAO procedente de guisante (*Pisum Sativum L.*) encapsulada y analizar el efecto de diferentes condiciones de temperatura y pH sobre su actividad enzimática a lo largo del almacenamiento.

La enzima DAO obtenida a partir de guisante puede ser una alternativa eficaz y sostenible para la elaboración de suplementos de DAO de origen vegetal y veganos. Además, debido a su estabilidad a diferentes pH, puede ser viable su adición en alimentos.

Este trabajo está relacionado con los siguientes ODS de la agenda 2030: ODS 3 – Salud y Bienestar; ODS 9 – Industria, Innovación e Infraestructuras; ODS 12 – Producción y consumo responsable; ODS 13 – Acción por el clima; ODS 15 – Vida de ecosistemas terrestres.

**Palabras clave:**

Diamino Oxidasa; vida útil; histaminosis; histamina.

**Title:** Encapsulation of DAO from peas and analysis of its enzymatic stability during storage at different temperature and pH conditions.

**Abstract:**

Histamine is a biogenic amine, a product of the decarboxylation of the amino acid L-histidine, a reaction catalyzed by the enzyme L-histidine decarboxylase (EC.4.1.1.22). In humans, this amine is involved in the inflammatory response, vasodilation, various physiological functions and acts as a neurotransmitter in the central nervous system. However, the accumulation of high levels of histamine in the blood or histaminosis can cause disorders such as headaches, abdominal swelling and hypotension, among others. Some fermented and/or cured foods tend to have an overgrowth of bacteria with decarboxylase activity that favors the formation of histamine. The consumption of these foods increases the levels of exogenous histamine in our body. When in our body there is a high accumulation of exogenous histamine or there is a deficiency of the enzyme Diamine Oxidase (DAO, EC.1.4.3.6), the enzyme responsible for metabolizing exogenous histamine during digestion, histamine can occur. Currently, there are DAO supplements obtained from pig kidney that are used to reduce the symptoms caused by histaminosis, however, they have a very low degradation capacity. It would be interesting to study other sources of DAO that are more effective and capable of degrading the histamine formed in food.

The objective of this work is to obtain encapsulated DAO enzyme from pea (*Pisum Sativum* L.) and analyze the effect of different temperature and pH conditions on its enzymatic activity throughout storage.

The DAO enzyme obtained from pea can be an effective and sustainable alternative for the production of plant-based and vegan DAO supplements. Furthermore, due to its stability at different pH, its addition to foods may be viable.

This work relates to the following SDGs of the 2030 Agenda: SDG 3 - Good health and well-being; SDG 9 - Industry, Innovation and Infrastructure; SDG 12 - Responsible production and consumption; SDG 13 - Climate action; SDG 15 - Life on land.

**Key words:**

Diamine Oxidase; lifetime; histaminosis; histamine.

**Títol:** Encapsulació de DAO de pèsol i anàlisi de la seua estabilitat enzimàtica durant el seu emmagatzematge a diferents condicions de temperatura i pH.

**Resum:**

La histamina és una amina biògena, producte de la descarboxilació de l'aminoàcid L-histidina, reacció catalitzada per l'enzim L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). En l'ésser humà, esta amina està involucrada en la resposta inflamatòria, en la vasodilatació, en diverses funcions fisiològiques i actua com a neurotransmissor en el sistema nerviós central. No obstant això, l'acumulació d'elevats nivells d'histamina en sang o histaminosi, pot produir trastorns com a cefalees, inflor abdominal i hipotensió, entre altres. Alguns aliments fermentats i/o curats solen tindre un sobrecreixement de bacteris amb activitat descarboxilasa que afavorix la formació d'histamina. El consum d'estos aliments augmenta els nivells d'histamina exògena en el nostre organisme. Quan en el nostre organisme hi ha una elevada acumulació d'histamina exògena o existix un dèficit de l'enzim Diamino Oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6), enzim encarregat de metabolitzar la histamina exògena durant la digestió es pot produir histaminosi. En l'actualitat, existixen suplementes de DAO obtinguts a partir de renyó de porc que s'utilitzen per a reduir els símptomes provocats per la histaminosi, no obstant això, tenen una capacitat de degradació molt baixa. Seria interessant estudiar altres fonts de DAO de major efectivitat i que siguen capaces de degradar la histamina formada en els aliments.

L'objectiu d'este treball és obtindre enzim DAO procedent de pèsol (\*Pisum \*Sativum L.) encapsulada i analitzar l'efecte de diferents condicions de temperatura i pH sobre la seua activitat enzimàtica al llarg de l'emmagatzematge.

L'enzim DAO obtinguda a partir de pèsol pot ser una alternativa eficaç i sostenible per a l'elaboració de suplementes de DAO d'origen vegetal i vegans. A més, a causa de la seua estabilitat a diferents pH, pot ser viable la seua addició en aliments.

Aquest treball esta relacionat amb els següents ODS de l'Agenda 2030: ODS 3 - Salut i benestar; ODS 9 - Indústria, Innovació i Infraestructures; ODS 12 - Producció i consum responsable; ODS 13 – Acció pel clima; ODS 15 - Vida d'ecosistemes terrestres.

**Palabras clave:**

Diamino Oxidasa; vida útil; histaminosis; histamina.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Principalmente, agradecer a Aitana Duch, su implicación, dedicación y ayuda a lo largo de todo el proyecto.

También agradecerles a Amparo Quiles e Isabel Hernando la oportunidad de participar en este proyecto, así como el esfuerzo y el tiempo invertido en él.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, en especial a mi madre, por su apoyo incondicional no solo en este proyecto si no en todos estos años.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1  |
| <b>1.1 La histamina.</b> .....   | 1  |
| <b>1.2 Histamina en los alimentos.</b> .....   | 2  |
| <b>1.3 DAO e Histaminosis.</b> .....   | 3  |
| <b>1.4 Obtención de DAO a partir de guisante.</b> .....  | 5  |
| <b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....  | 5  |
| <b>2.1 Objetivo general.</b> .....   | 5  |
| <b>2.2 Objetivos específicos</b> .....   | 5  |
| <b>2.3 Plan de trabajo</b> .....   | 6  |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 6  |
| <b>3.1 Materia prima</b> .....   | 6  |
| <b>3.2 Germinación</b> .....   | 6  |
| <b>3.3 Extracción enzimática</b> .....   | 7  |
| <b>3.4 Determinación de la actividad enzimática específica de DAO</b> .....  | 7  |
| <b>3.4.1 Actividad enzimática</b> .....  | 7  |
| <b>3.4.2 Contenido en proteína</b> .....   | 9  |
| <b>3.5 Encapsulación de DAO</b> .....  | 9  |
| <b>3.6 Análisis de la estabilidad enzimática de la DAO, encapsulada, durante su almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura y pH.</b> ..... | 10 |
| <b>3.7 Análisis estadístico</b> .....  | 11 |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....   | 11 |
| <b>4.1 Actividad enzimática específica de la DAO.</b> .....  | 11 |
| <b>4.2 Actividad enzimática específica de la DAO antes y después de encapsular.</b> .....  | 11 |
| <b>4.3 Análisis de la estabilidad enzimática de la DAO, encapsulada, durante su almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura.</b> .....   | 11 |
| <b>4.4 Análisis de la estabilidad enzimática de la DAO, encapsulada, durante su almacenamiento bajo diferentes condiciones de pH.</b> .....            | 13 |
| <b>5. CONCLUSIONES</b> .....   | 15 |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | 17 |
| <b>7. ANEXOS</b> .....   | 19 |
| <b>ANEXO I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030</b> .....  | 19 |
| <b>ANEXO II. Material suplementario</b> .....  | 21 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Esquema de la regulación de la histamina en personas sanas (A), con una intoxicación por histamina (B) y con déficit de DAO (C) (Comas-Basté et al., 2020b).....   | 4  |
| <b>Figura 2.</b> Principales síntomas de la intolerancia a la histamina (Comas-Basté et al., 2020b). .....  | 4  |
| <b>Figura 3.</b> Guisantes germinados durante 6 días .....  | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Reacción enzimática (modificada a partir de Cebrián et al, 2018). .....  | 8  |
| <b>Figura 5.</b> Equipo Buchi B-290 con una boquilla de tres fluidos. ....  | 10 |
| <b>Figura 6.</b> Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre temperatura de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática. ....   | 12 |
| <b>Figura 7.</b> Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre tiempo de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática. ....  | 12 |
| <b>Figura 8.</b> Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre temperatura y tiempo de almacenamiento para el porcentaje de actividad enzimática. ....  | 13 |
| <b>Figura 9.</b> Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre tiempo de almacenamiento y fuente de DAO para porcentaje actividad enzimática. ....  | 14 |
| <b>Figura 10.</b> Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre pH y fuente de DAO para porcentaje actividad enzimática. ....   | 14 |
| <b>Figura 11.</b> Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre pH y tiempo de almacenamiento para porcentaje actividad enzimática. ....  | 15 |
| <b>Figura 12.</b> Gráfico de barras de la estabilidad térmica (-18°C, 4°C y 23°C) de la DAO de guisante (DAO gui) y DAO de porcino (DAO por), encapsuladas, durante el almacenamiento a 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses. .... | 21 |
| <b>Figura 13.</b> Gráfico de barras de la estabilidad al pH (pH 3, pH 5 y pH 7) de la DAO de guisante (DAO gui) y DAO de porcino (DAO por), encapsuladas, durante el almacenamiento a 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses. ....   | 22 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Cantidad de histamina presente en algunos alimentos (Comas-Basté et al., 2020b) .....  | 2  |
| <b>Tabla 2.</b> Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de la enzima DAO obtenida a partir de guisantes y de la DAO obtenida a partir de porcino antes y después de su encapsulación (encapsulada). .....   | 11 |
| <b>Tabla 3.</b> Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para la agenda 2030.....  | 19 |
| <b>Tabla 4.</b> Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de DAO encapsulada, 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..... | 21 |
| <b>Tabla 5.</b> Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de DAO encapsulada, de guisante y de porcino, almacenada a diferentes pHs (pH 3, pH5 y pH 7) durante 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses. ....          | 22 |



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La histamina.

La histamina es una amiga biógena que se produce en el organismo debido a la descarboxilación del aminoácido histidina, reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). En el organismo existe la presencia de histamina de origen endógeno, la cual es producida por el propio organismo (mastocitos, plaquetas...) e histamina exógena, la cual llega al organismo a través de la ingesta de alimentos, siendo absorbida en el intestino delgado y llegando al torrente sanguíneo. Un exceso de histamina puede producir efectos perjudiciales como la aparición de taquicardias, arritmias, aumento de la secreción de jugos gástricos, etc.

Funcionalmente, la histamina participa en diversos mecanismos inmunológicos y fisiológicos, por ejemplo, promoviendo la secreción de ácido gástrico, la vasodilatación, la producción de citocinas, etc. La histamina, además, actúa como neurotransmisor, siendo sintetizada por neuronas ubicadas en la parte posterior del hipotálamo (Comas-Basté et al., 2020b).

Estos efectos fisiológicos se producen debido a su interacción con cuatro receptores específicos ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  y  $H_4$ ) acoplados a proteínas G que activan vías de transducción de señales al percibir la histamina. Dichos receptores se localizan en diferentes tejidos y producen diversos efectos. A continuación, se detallan sus localizaciones y efectos (Montes J et al., 2005):

- $H_1$ : Se localizan principalmente en el músculo liso de los bronquios, intestino, vías urinarias y vasos sanguíneos, además también tienen una amplia distribución en el sistema nervioso central (SNC). Sus principales efectos son la contracción del músculo liso bronquial, hipotensión, aumento de la permeabilidad vascular, cefaleas, etc.
- $H_2$ : Se encuentran principalmente en tejidos periféricos como el músculo liso vascular y del útero, en las células endoteliales y epiteliales, los neutrófilos, los eosinófilos o los linfocitos entre otros. Su efecto principal es la secreción ácida gástrica, también induce la relajación del músculo liso bronquial, vascular y uterino.
- $H_3$ : La mayoría de estos receptores se localizan en el SNC, aunque también pueden encontrarse en nervios periféricos del corazón y del tracto gastrointestinal. Respecto a sus funciones, estos receptores previenen la broncoconstricción excesiva, inhiben la secreción de ácido gástrico, producen vasodilatación de los vasos cerebrales e inhiben la síntesis y liberación de la histamina.
- $H_4$ : Se localizan principalmente en células hematopoyéticas como las células dendríticas, los mastocitos, los eosinófilos, los mastocitos, etc. Por otro lado, también se encuentran en niveles considerables en las células del pulmón, hígado, bazo, SNC, corazón y músculo esquelético. Estos receptores tienen un papel importante en las respuestas inmunes.

La histamina puede metabolizarse siguiendo dos rutas: por desaminación oxidativa gracias a la enzima Diamino Oxidasa (DAO) o por metilación del anillo imidazólico debido a la

acción de la enzima histamina-N-metiltransferasa (HNMT). La ruta de metabolización dependerá de la ubicación de la histamina. Si la histamina es exógena, será metabolizada por la DAO, ésta degrada la histamina por oxidación de su grupo amino. Por otro lado, la HNMT degrada la histamina endógena por metilación del anillo imidazólico formando N-metilhistamina (Comas-Basté et al., 2020b); debido a que esta enzima es una proteína citosólica tan solo puede degradar la histamina en el espacio intracelular de los tejidos, es por ello que su actividad es significativamente menor a la actividad de la DAO en el intestino (International Society of DAO Deficiency, s. f.).

## 1.2 Histamina en los alimentos.

La histamina está presente en una amplia gama de alimentos en concentraciones muy variables. La formación de histamina en los alimentos requiere disponibilidad de aminoácidos libres, en concreto de la histidina y de microorganismos descarboxilasa-positivos, es decir, capaces de transformar la histidina en histamina (Comas-Basté et al., 2020b). Los productos fermentados y madurados como el queso o el vino y, algunas especies de pescado como por ejemplo el atún, la sardina, el boquerón o la caballa, suelen presentar altas concentraciones de estos compuestos. Otro aspecto que influye en el contenido en histamina en los alimentos son las condiciones poco higiénicas, además, la formación de histamina se ve favorecida en condiciones que permiten el crecimiento bacteriano con actividad descarboxilasa, como las altas temperaturas y los pHs bajos (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2022). Estas condiciones se ven favorecidas durante el deterioro o proceso de proteólisis de los alimentos. Por ello, la carne, el pescado y los productos madurados/fermentados son aquellos que presentan mayores contenidos en histamina.

La formación de histamina en el alimento se puede reducir si el alimento se conserva en congelación o en refrigeración a una temperatura menor de 4°C. Sin embargo, una vez se ha generado en el alimento, la histamina es difícil de eliminar debido a que resiste los tratamientos térmicos (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2022).

La Tabla 1 muestra el contenido en histamina de diferentes alimentos (Comas-Basté et al., 2020b):

**Tabla 1.** Cantidad de histamina presente en algunos alimentos (Comas-Basté et al., 2020b)

| Alimento                   | Contenido en histamina (mg/kg) |
|----------------------------|--------------------------------|
| Frutas                     | ND-2.51                        |
| Frutos secos               | ND-11.86                       |
| Verduras                   | ND-69.72                       |
| Legumbres                  | ND-ND                          |
| Cereales                   | ND-0.89                        |
| <b>Bebidas alcohólicas</b> |                                |
| Cerveza                    | ND-21.60                       |

|  |           |
|--|-----------|
| Vino blanco                            | ND-13.00  |
| Vino tinto                             | ND-55.00  |
| <b>Productos de pescado y mariscos</b> |           |
| Pescado fresco                         | ND-36.55  |
| Pescado en conserva                    | ND-657.05 |
| Pescado en semiconserva                | ND-34.90  |
| <b>Carne y productos cárnicos</b>      |           |
| Carne fresca                           | ND-ND     |
| Carne cocida                           | ND-4.80   |
| Embutidos                              | ND-150.00 |

ND: No detectado

### 1.3 DAO e Histaminosis.

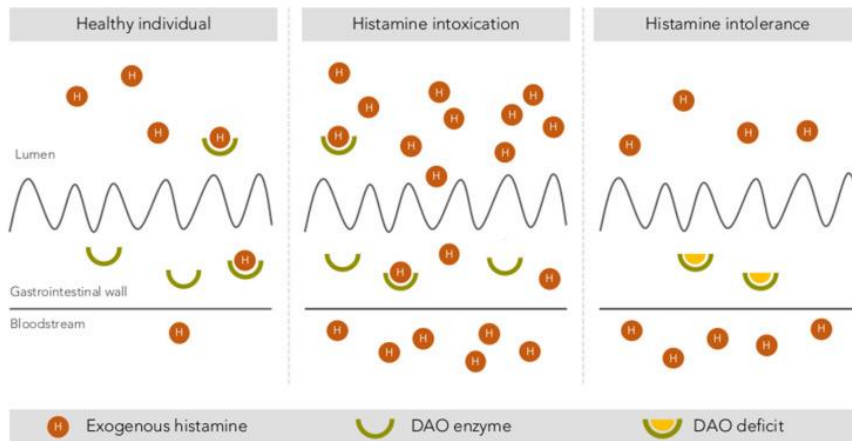
La enzima Diamino Oxidasa desempeña un papel crucial en la degradación de la histamina exógena. Dicha degradación se produce en el intestino, ya que la enzima DAO se almacena en las estructuras vesiculares del intestino y se une a la membrana plasmática de las células. La DAO requiere de la presencia de cofactores esenciales, como la vitamina B6 y C, así como del cobre para su correcto funcionamiento.

La deficiencia de DAO en el organismo se presenta como una disminución de la actividad de la enzima en el intestino delgado, produciéndose una reducción de la degradación de la histamina y por consecuencia un aumento de su concentración en el plasma (International Society of DAO Deficiency, s. f.).

Cuando se produce la acumulación de histamina en el organismo se emplea el término histaminosis. Existen varias causas que pueden producir histaminosis, por ejemplo (Ortolani C et al., 2006):

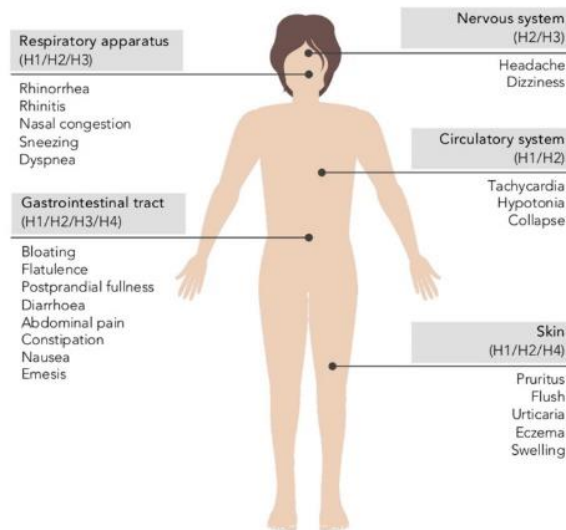
- Consumo muy elevado de histamina exógena
- Incapacidad por parte del organismo de metabolizar la histamina.

En el caso del consumo elevado de histamina exógena, se produce una intoxicación histamínica en la que los mecanismos de metabolización resultan insuficientes. Por otro lado, la intolerancia a la histamina se produce cuando existe un inadecuado funcionamiento de los mecanismos de metabolización de la histamina; este inadecuado funcionamiento puede tener origen genético, patológico o debido a un bloqueo farmacológico de las enzimas que metabolizan la histamina, por lo que se produce una acumulación excesiva de histamina. La intolerancia a la histamina se diferencia de la intoxicación histamínica porque los efectos adversos pueden aparecer tras el consumo de alimentos con concentraciones bajas de histamina (Veciana Nogués y Vidal Carou, 2008). En la Figura 1 se observa de forma esquemática la regulación de la histamina en diferentes situaciones (Comas-Basté et al., 2020b):



**Figura 1.** Esquema de la regulación de la histamina en personas sanas (A), con una intoxicación por histamina (B) y con déficit de DAO (C) (Comas-Basté et al., 2020b).

Se estima que el 1% de la población es intolerante a la histamina. Los síntomas comunes producidos por la histaminosis son muy similares a los de una reacción alérgica, aunque generalmente, más leves. En general, cuando se produce la intoxicación los síntomas suelen tener una duración corta de tiempo (horas) y no suelen requerir de tratamiento (Comas-Basté et al., 2020b). Los síntomas más comunes se muestran en la Figura 2.



**Figura 2.** Principales síntomas de la intolerancia a la histamina (Comas-Basté et al., 2020b).

La histaminosis en algunos individuos se debe a un desequilibrio entre la cantidad de histamina exógena y la actividad de DAO en el intestino; esto provoca un aumento de la permeación transepitelial de la histamina y por consiguiente una acumulación de esta en el torrente sanguíneo.

La actividad de DAO puede verse afectada por varios factores como:

- Inhibición de la enzima por la ingesta de alcohol, drogas u otras aminas biógenas
- Desnutrición, lo que conlleva que se produzca un déficit de las enzimas cofactores B6, cobre y vitamina C

- Predisposición genética

Una concentración de histamina de 500 mg/kg o superior puede presentar un potencial riesgo para la salud (Archives & Administration, 1982; DeBeer et al., 2021)

Cuando se produce la histaminosis existen dos soluciones para tratar la intolerancia a la histamina, la primera solución consiste en llevar una dieta muy restrictiva baja en histamina. Por otro lado, la segunda opción consiste en tomar suplementos de enzima DAO.

#### **1.4 Obtención de DAO a partir de guisante.**

En la actualidad los suplementos de DAO que se comercializan están compuestos por DAO extraída a partir de riñón de cerdo, pero dicho suplemento posee una baja eficacia, ya que, tan solo es capaz de metabolizar entre un 12-14% de la histamina que llega al intestino; es por ello por lo que aun consumiendo suplementos se debe combinar con una dieta baja en histamina.

Comas-Basté et al., 2020a, investigaron la actividad de la DAO extraída de guisantes en sistemas modelo y resultó ser casi dos veces superior que la de los suplementos comerciales extraídos de riñón de cerdo.

Por otro lado, Weng et al., 2023, investigaron la microencapsulación de DAO para mejorar la estabilidad de la actividad enzimática. Para dicha encapsulación, se empleó alginato, un polisacárido extraído de las algas, que comúnmente se utiliza para estabilizar proteínas y compuestos bioactivos. Tras la investigación los resultados obtenidos demostraron que la encapsulación mejoró casi cuatro veces más la estabilidad térmica de la enzima.

La obtención de extractos vegetales con alta actividad enzimática de DAO podrían ser una alternativa interesante a los suplementos comerciales de DAO de origen animal que existen en la actualidad. Estos extractos vegetales podrían cumplir las preferencias/exigencias de una mayor parte de la población que, cada vez más, prefieren productos de origen vegetal.

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

### **2.1 Objetivo general**

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

### **2.2 Objetivos específicos**

Para lograr el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Germinar guisantes amarillos (*Pisum Sativum L.*) para luego extraer la enzima DAO.

2. Encapsular la enzima DAO, obtenida a partir de guisantes y la enzima DAO comercial procedente de riñón de cerdo, mediante la técnica de secado por pulverización (*spray drying*).
3. Evaluar la estabilidad de las cápsulas de DAO durante su almacenamiento a lo largo del tiempo bajo diferentes condiciones de temperatura y pH.

### 2.3 Plan de trabajo

Para llevar a cabo los objetivos planteados se realizó el siguiente plan de trabajo:

1. Revisión de estudios previos sobre la histamina, fuentes de diamino oxidasa, métodos de extracción enzimática, determinación de la actividad enzimática, encapsulación y estabilidad de enzimas frente a diversas condiciones de almacenamiento.
2. Germinación de guisantes amarillos (*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 de la actividad enzimática y contenido en proteína de los extractos de DAO obtenidos a partir de guisantes germinados y en la DAO comercial procedente de riñón de cerdo.
4. Encapsulación enzimática de la DAO de guisante y de porcino, mediante la técnica de secado por pulverización (*spray drying*).
5. Análisis de la estabilidad enzimática de la enzima DAO encapsulada durante el almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura y pH.
6. Análisis y discusión de los resultados obtenidos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Materia prima

En este trabajo, se empleó como materia prima guisantes amarillos forrajeros (*Pisum sativum L.*) que fueron facilitados por La Fábrica de Piensos del Departamento de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València y extracto de DAO de origen animal (riñón de cerdo) que se adquirió en Sigma-Aldrich.

### 3.2 Germinación

Previo a la germinación, se humedecieron los guisantes durante 12 h. Para ello, se introdujeron 40 g de guisantes dentro de un bote de vidrio con 200 mL de agua destilada que se almacenó en oscuridad. Pasadas las 12 h, se retiró el agua de los botes con un tamiz y se colocaron los guisantes, uniformemente, en un recipiente de vidrio hermético dentro de la cámara de germinación.

Los guisantes se germinaron durante 6 días a 27°C en condiciones de oscuridad para someter a las semillas a estrés y así favorecer la síntesis de la enzima DAO. Cada recipiente contenía un crisol con una solución sobresaturada de NaCl (40 g) y agua destilada (12 mL) que permitía mantener una humedad constante del 80% (Simatos y Multon, 1985).



**Figura 3.** Guisantes germinados durante 6 días

Transcurrido el tiempo de germinación, las muestras se liofilizaron durante 48 h para eliminar por completo el agua de las legumbres, posteriormente se trituraron y tamizaron para obtener un polvo homogéneo.

Finalmente, el polvo de guisante obtenido se envasó a vacío y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3.3 Extracción enzimática**

Para la extracción enzimática de DAO a partir de polvo de guisantes germinados, se pesaron 4 g de polvo en tubos de centrífuga 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). Tras añadir la muestra y el tampón en el tubo, la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , pasado este tiempo se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min y a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este proceso de repitió hasta un total de tres veces. El sobrenadante recogido de cada centrifugación se juntó y se enrasó hasta 50 mL con el tampón fosfato preparado. A continuación, se filtró el extracto obtenido para eliminar los sólidos en suspensión (filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$  acoplado a una bomba de vacío) (Yang et al., 2012). Finalmente, el extracto se liofilizó y se almacenó  $-18^{\circ}\text{C}$  en recipientes opacos hasta su utilización.

### **3.4 Determinación de la actividad enzimática específica de DAO**

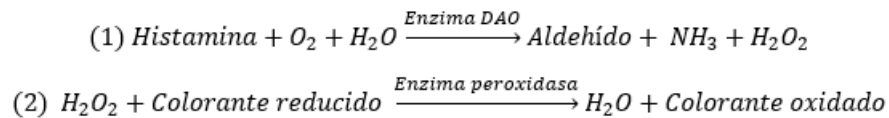
La actividad enzimática específica de la enzima DAO se expresó en unidades por miligramo de proteína (U/mg) y se calculó a partir de la determinación de la actividad enzimática total (U) y el contenido de proteína en los extractos de DAO.

#### **3.4.1 Actividad enzimática**

##### Fundamentos de la reacción

Las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante el proceso de determinación de la actividad de DAO se basan en reacciones redox. En esta reacción, se emplea la DA-67 que es una sustancia que produce una señal analítica (cambio de color) fácilmente detectable cuando se oxida y la cual permite relacionar la cantidad de sustrato degradado (histamina) por la enzima DAO.

La reacción enzimática se divide en dos reacciones en serie que son las siguientes:



**Figura 4.** Reacción enzimática (modificada a partir de Cebrián et al, 2018).

En primer lugar (1), la enzima DAO cataliza la reacción entre la histamina y el oxígeno, generando como resultado peróxido de hidrógeno. A continuación, en la siguiente reacción (2), la enzima peroxidasa (POD) cataliza la reacción entre el peróxido generado anteriormente y la forma reducida del colorante DA-67, obteniendo agua, oxígeno y el colorante oxidado, como productos de la reacción. En ese momento, el colorante ha cambiado de color y ha pasado de ser incoloro (forma reducida) a tener un color azulado (forma oxidada), detectable en el espectrofotómetro a 668 nm.

#### Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de las muestras se determinó mediante el método colorimétrico, utilizando la sustancia DA-67 e histamina como sustrato. En primer lugar, se añadieron 750  $\mu\text{L}$  de disolución de histamina (1mM; disuelta en PIPES 25 mM y pH 7,2) y 726  $\mu\text{L}$  de DA-67 (50  $\mu\text{M}$ ; disuelto en PIPES 25 mM y pH 7,2) en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La mezcla se agitó y se incubó en un baño de agua durante 10 min a 37°C.

Pasado dicho tiempo, se agregaron 24  $\mu\text{L}$  de peroxidasa (POD) (266 U/mL; disuelta en PIPES 25 mM y pH 7,2) y 50  $\mu\text{L}$  del extracto de las muestras obtenidas previamente. Nuevamente, la mezcla se agitó y se realizó una segunda incubación en el baño a 37°C durante otros 10 min.

Transcurridos los 10 min, se añadió 50  $\mu\text{L}$  de dietilditiocarbamato sódico (30mM) para detener la reacción. Finalmente, los Eppendorf se centrifugaron durante 3 min a 10.000 rpm y a 20°C y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 668 nm.

Para el cálculo de la actividad enzimática se empleó una recta de calibrado, para ello, se prepararon disoluciones con concentraciones entre 0,5 y 20  $\mu\text{mol/mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se siguió el procedimiento anteriormente descrito, reemplazando los 750  $\mu\text{L}$  de histamina iniciales por 750  $\mu\text{L}$  de tampón PIPES 25 mM y los 50  $\mu\text{L}$  de muestras se sustituyeron por 50  $\mu\text{L}$  de las disoluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  preparadas previamente. Finalmente, se midió la absorbancia de las diferentes muestras y se representó en una gráfica la concentración de las diferentes disoluciones frente a la absorbancia medida.

Por otro lado, para evitar posibles interferencias causadas por aminas biógenas presentes en los extractos, se preparó una referencia para cada muestra, en la que se sustituyó la disolución de histamina por 750  $\mu\text{L}$  de tampón PIPES (25 mM y pH 7,2). La absorbancia de la referencia se restó a la absorbancia obtenida de la muestra.



La actividad enzimática se expresó como unidad de actividad enzimática (U) y 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 Contenido en proteína

Para la determinación del contenido en proteína se empleó el método de Bradford. Se trata de una técnica colorimétrica basada en la medida de la variación de absorbancia debido a la interacción entre las proteínas y el reactivo de Bradford, preparada a partir del colorante azul brillante de Coomassie G-250.

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

Para la determinación, se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra del extracto de guisante con 5 mL de disolución de Coomassie, se agitó y se dejó actuar, en oscuridad, durante 2 min. Transcurrido el tiempo, se agitó de nuevo y se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

Para el cálculo del contenido en proteína se empleó una recta de calibrado la cual se preparó con diferentes cantidades de proteína de albúmina de suero bovina (BSA) comprendidas entre 0 y 10 mg/mL.

El contenido en proteína se determinó para conocer la actividad específica (U/mg de proteína) de las muestras y así poder referenciar la actividad enzimática de DAO con respecto a la cantidad de proteína presente en dicha muestra.

### 3.5 Encapsulación de DAO

Para la encapsulación de la enzima DAO, de origen vegetal y animal, se empleó la técnica de secado por pulverización (*spray drying*) (Weng, Y. et al, 2023). Esta técnica es muy utilizada en la industria, se trata de un proceso sencillo, escalable y sostenible.

La encapsulación enzimática, se realizó utilizando un equipo de secado tipo Buchi B-290 con una boquilla de tres fluidos que, permite la entrada al equipo, de forma simultánea y por tres vías independientes, de la disolución protectora (*shell*), de núcleo (*core*) y la entrada de aire. La enzima se diluye en la disolución de *core*, dónde también se encuentra el cloruro de calcio que, junto con el alginato (en la disolución de protección o *shell*) permiten formar la cápsula. Las condiciones de trabajo del equipo son imprescindibles para conseguir buenos resultados de encapsulación. En este caso, las condiciones de trabajo fueron las siguientes: flujo de alimentación *shell:core* (mL/min) 5:5; 60 mm de caudal de aire comprimido; 3,5 bares de presión de entrada del aire, 190°C y 80°C

temperaturas de entrada y de salida de la muestra, respectivamente, y un flujo de aire de 32 m<sup>3</sup>/h. La disolución *shell* se preparó con una concentración de 0,01 g de alginato/mL y la disolución *core* con una concentración de 0,06 g de cloruro de calcio/mL y 0,02 g de enzima/mL.



**Figura 5.** Equipo Buchi B-290 con una boquilla de tres fluidos.

Una vez obtenidas las cápsulas, se determinó la actividad enzimática específica residual de la DAO. Para ello, se diluyeron 20 mg de cápsulas en 1 mL de disolución tampón (ácido cítrico 0,1 M y fosfato disódico 0,2 M) a pH 6 en un baño de 25°C durante 15 min.

### **3.6 Análisis de la estabilidad enzimática de la DAO, encapsulada, durante su almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura y pH.**

Con el objetivo de determinar la estabilidad durante el almacenamiento de la enzima DAO de guisante y de porcino, encapsuladas, éstas se almacenaron a diferentes temperaturas: -18°C, 4°C y 23°C (en una disolución tampón con un pH 7) y a diferentes pH: 3, 5 y 7 (a una temperatura de 4°C).

Las muestras se prepararon pesando 20 mg de cápsulas en un Eppendorf que, se diluyeron con 1 mL de 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 para la preparación del tampón, según el pH requerido. Además, se añadieron 50µL de azida sódica (0,01g/mL) para evitar la aparición de moho durante el almacenamiento.

Se determinó la actividad enzimática específica de las muestras a la hora, a los siete días, al mes y a los dos meses de almacenamiento. Para ello, las cápsulas de DAO se rompieron ajustando el pH de cada disolución tampón hasta pH 6, en un baño de 25°C durante 15 min.

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%.

### 3.7 Análisis estadístico

La evaluación estadística de los resultados se realizó utilizando el programa Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Technologies Inc., EE. UU.). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para la optimización de las condiciones de pH y temperatura de almacenamiento en la estabilidad enzimática de la DAO. Para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras se empleó el método HSD (Honestly Significant Difference), con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0.05).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Actividad enzimática específica de la DAO.

La actividad enzimática específica de los extractos de DAO obtenidos a partir de guisantes fue de 0,11 U/mg de proteína mientras que la de la DAO comercial (procedente de riñón de cerdo) fue de 0,04 U/mg de proteína. La DAO de origen vegetal mostró una actividad enzimática específica de un 175% superior a la de la DAO comercial.

### 4.2 Actividad enzimática específica de la DAO antes y después de encapsular.

En la Tabla 2 se reflejan los resultados de actividad enzimática específica de la DAO antes y después de su encapsulación.

**Tabla 2.** Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de la enzima DAO obtenida a partir de guisantes y de la DAO obtenida a partir de porcino antes y después de su encapsulación (encapsulada).

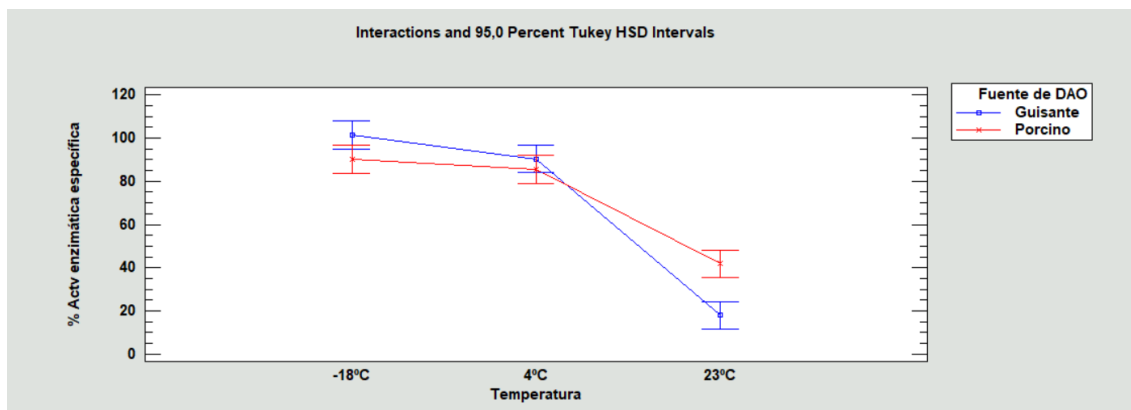
|                 | Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) |               |
|-----------------|--|---------------|
|                 | Previa a encapsulación                             | Encapsulada   |
| DAO de guisante | 0,110 ± 0,003                                      | 0,099 ± 0,006 |
| DAO de porcino  | 0,042 ± 0,004                                      | 0,043 ± 0,001 |

Como se puede observar en la Tabla 2, la encapsulación enzimática no interfirió en la actividad enzimática específica de la enzima DAO, independientemente de su origen. No se observaron diferencias significativas (p>0,05) entre los valores de actividad enzimática específica obtenidos antes y después de la encapsulación enzimática.

### 4.3 Análisis de la estabilidad enzimática de la DAO, encapsulada, durante su almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura.

El análisis de interacciones entre los factores fuente de DAO, temperatura y tiempo de almacenamiento para el parámetro porcentaje de actividad enzimática específica mostró interacciones significativas entre todos los factores y la influencia de los factores fue significativa.

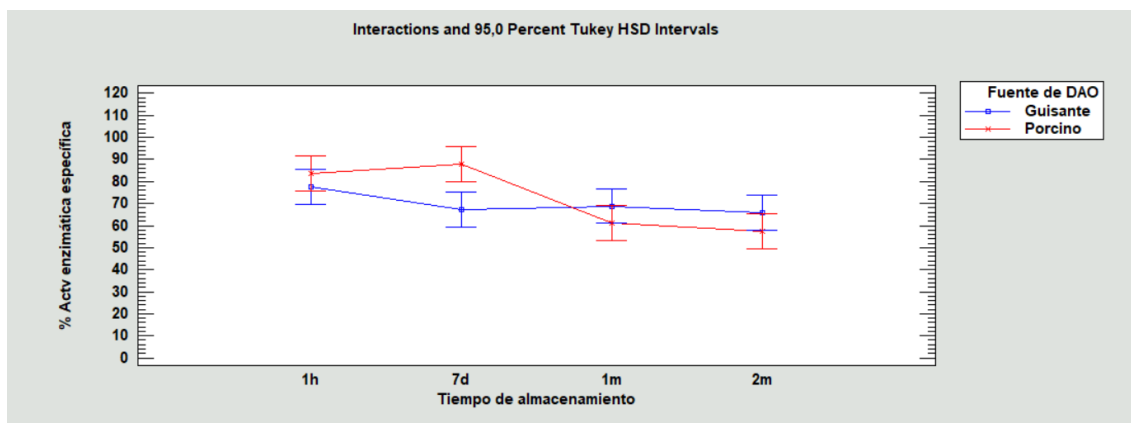
En la Figura 6 se muestra el gráfico de interacciones entre la temperatura de almacenamiento y la fuente de DAO utilizada.



**Figura 6.** Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre temperatura de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática.

Independientemente de la fuente de DAO utilizada, el aumento de temperatura de almacenamiento a 23°C provocó una pérdida significativa en el porcentaje de actividad enzimática. La DAO de guisante tan sólo mantuvo un 20% de su actividad específica inicial y la de porcino un 45%. Para ambas enzimas encapsuladas, la procedente de guisante y la de porcino, las temperaturas de almacenamiento más adecuadas fueron -18°C y 4°C, manteniendo, a estas temperaturas, prácticamente toda su actividad enzimática.

La Figura 7, que se observa a continuación, muestra el gráfico de interacciones entre el tiempo de almacenamiento y la fuente de DAO utilizada.

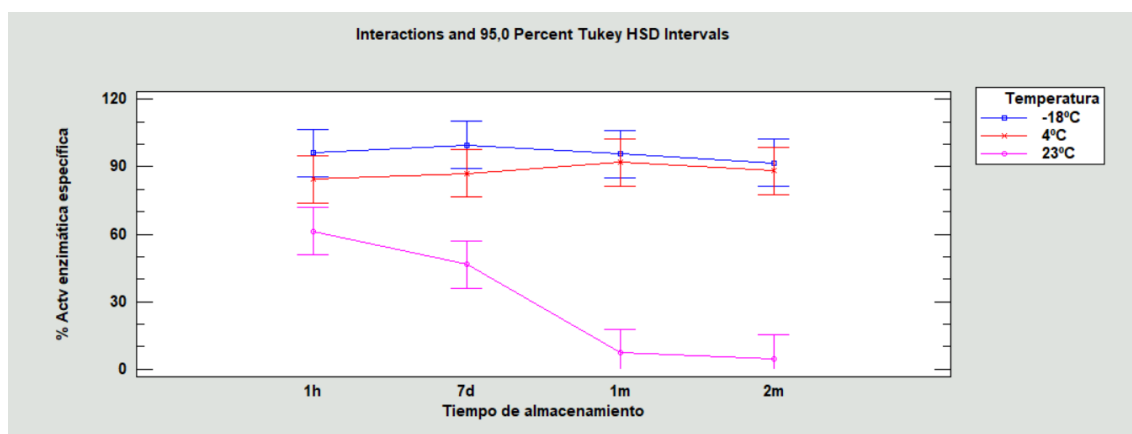


**Figura 7.** Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre tiempo de almacenamiento y fuente de DAO para el porcentaje de actividad enzimática.

Como se puede observar en la Figura 7, en el caso de la DAO de guisante, no se apreciaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los % de actividad enzimática a lo largo del tiempo de

almacenamiento. Por otro lado, la DAO de porcino mostró un descenso significativo en su actividad enzimática tras 1 mes de almacenamiento (59 % de actividad enzimática) y a partir de ese momento y hasta los 2 meses se mantuvo constante. En definitiva, la DAO encapsulada de guisante mostró mayor estabilidad enzimática tras dos meses de almacenamiento con respecto a la DAO encapsulada de porcino.

Finalmente, la Figura 8 muestra el gráfico de interacciones entre el tiempo y la temperatura de almacenamiento.



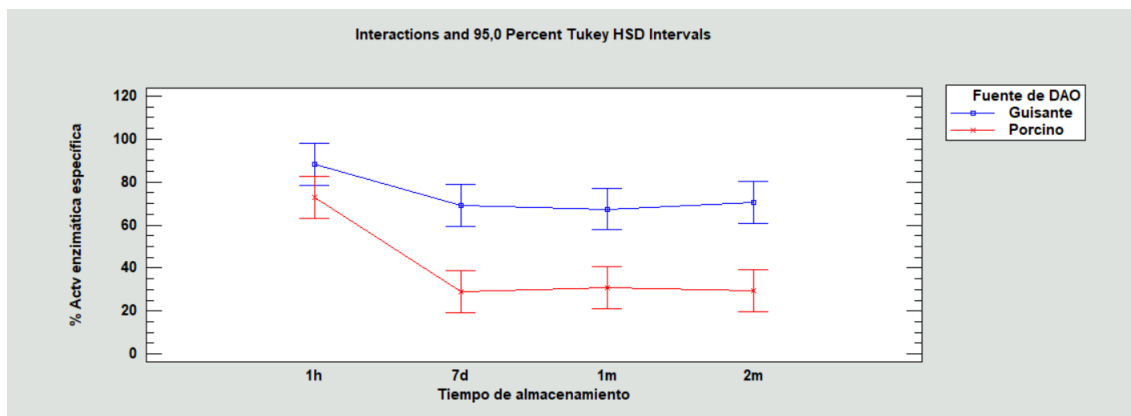
**Figura 8.** Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre temperatura y tiempo de almacenamiento para el porcentaje de actividad enzimática.

Como se puede observar (Figura 8) la actividad enzimática específica se mantuvo estable cuando las temperaturas de almacenamiento fueron -18°C y 4°C. Por otro lado, cuando se almacenó la DAO encapsulada a una temperatura de 23°C se produjo una reducción de su porcentaje de actividad enzimática específica considerable que, llegó a ser cero después de 1 mes de almacenamiento.

#### 4.4 Análisis de la estabilidad enzimática de la DAO, encapsulada, durante su almacenamiento bajo diferentes condiciones de pH.

El análisis de interacciones entre los factores fuente de DAO, pH y el tiempo de almacenamiento para el parámetro porcentaje de actividad enzimática mostró interacciones significativas entre todos los factores y los tres factores fueron significativos.

En la Figura 9, se muestra el gráfico de interacción entre la fuente de DAO utilizada y el tiempo de almacenamiento.

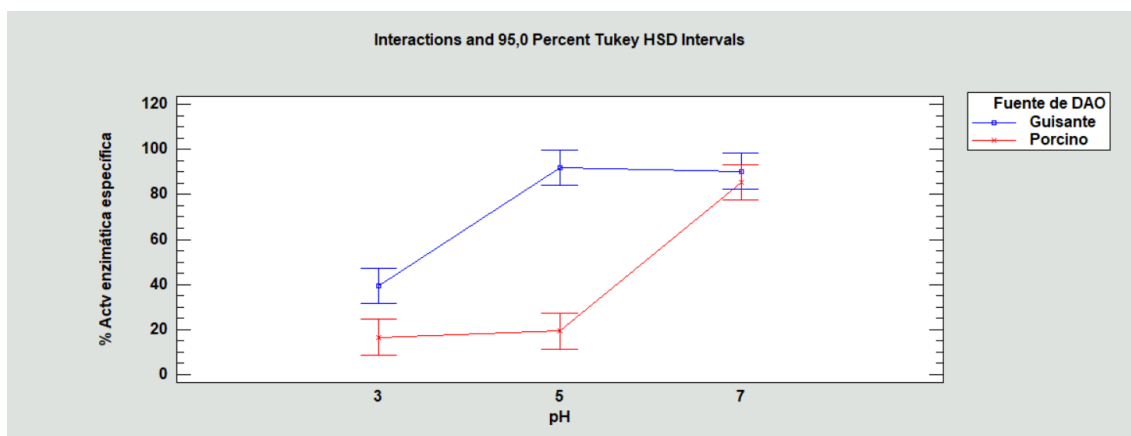


**Figura 9.** Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre tiempo de almacenamiento y fuente de DAO para porcentaje actividad enzimática.

Como se puede observar (Figura 9) los valores de actividad enzimática de la DAO de guisante se mantuvieron estables y constantes durante los 2 meses de almacenamiento. En el caso de la DAO de porcino, se detectó una disminución significativa en su actividad enzimática tras 7 días de almacenamiento, manteniendo sólo un 30% de su actividad enzimática inicial. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los porcentajes de actividad enzimática tras 7 días, 1 mes y 2 meses de almacenamiento.

En general, se puede observar que la actividad enzimática de la DAO encapsulada procedente de guisante tuvo mayor estabilidad durante los dos meses de almacenamiento que la DAO encapsulada procedente de porcino.

La Figura 10 muestra el gráfico de interacciones entre la fuente de DAO utilizada y el pH.



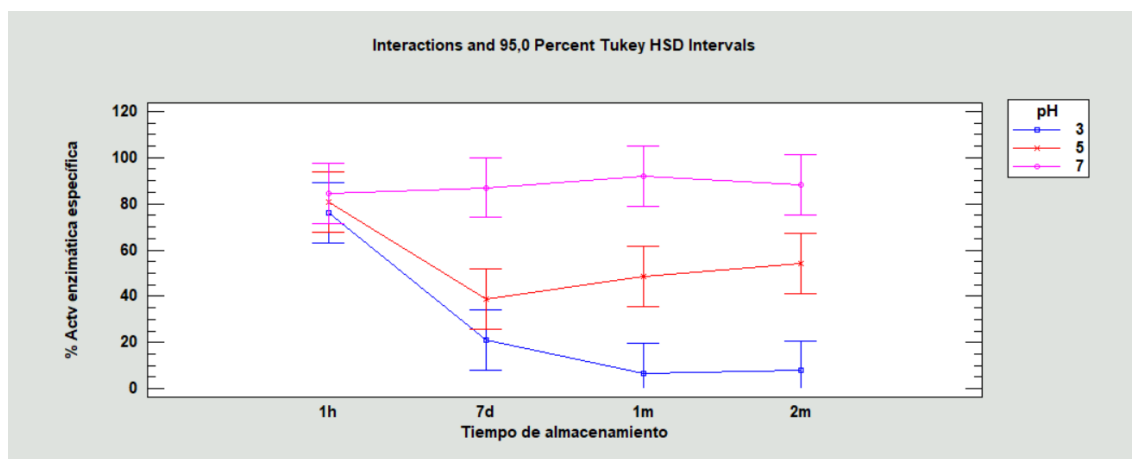
**Figura 10.** Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre pH y fuente de DAO para porcentaje actividad enzimática.

Como se puede observar (Figura 10) la DAO de guisante mostró mayor estabilidad a pHs más elevados, concretamente a pH 5 y 7. Los valores de actividad enzimática fueron significativamente más bajos a pH 3 (40% de su actividad enzimática específica inicial) que a pH 5 y 7. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los porcentajes de actividad enzimática entre las muestras almacenadas a pH 5 y 7. La DAO encapsulada de porcino fue estable a pH 7, sin embargo, a pH 3 y 5 su porcentaje de actividad enzimática

fue significativamente inferior ( $p < 0,05$ ), mostrando un 15% de su actividad enzimática específica inicial. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los porcentajes de actividad enzimática a pH 3 y pH 5.

Por tanto, la DAO encapsulada procedente de guisante parece presentar estabilidad a un mayor rango de pHs durante el almacenamiento que la DAO encapsulada de porcino.

En la Figura 11 se muestra el gráfico de interacciones entre el pH y el tiempo de almacenamiento.



**Figura 11.** Gráfico de interacciones con intervalos HSD entre pH y tiempo de almacenamiento para porcentaje actividad enzimática.

En la Figura 11 se observa que la mayor estabilidad enzimática a lo largo del tiempo se consiguió cuando las muestras se almacenaron a pH 7. El almacenamiento a pH 5 produjo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje de actividad enzimática durante los dos meses de almacenamiento. Este descenso en la actividad se hizo patente a los 7 d y se mantuvo constante hasta el final del periodo de almacenamiento. El almacenamiento a pH 3 provocó una pérdida notable de la actividad enzimática de la DAO, mostrando al mes de almacenamiento un 10% de su actividad específica inicial.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que la enzima DAO obtenida a partir de guisantes presenta una actividad enzimática específica de 2,75 veces superior a la de la DAO obtenida a partir de riñón de cerdo.

El proceso de encapsulación enzimática mediante secado por pulverización no interfiere en la actividad enzimática específica de la DAO ya que ésta se mantiene después de la encapsulación.

El almacenamiento de la enzima DAO encapsulada a diferentes temperaturas y pHs, puede influir en su estabilidad enzimática. Por lo general, las temperaturas óptimas de almacenamiento, independientemente del origen de la DAO, son de  $-18^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  ya que permiten mantener la estabilidad enzimática tras 2 meses de almacenamiento.

La DAO encapsulada procedente de guisante se mantiene estable cuando se almacena durante dos meses a pH 5 y 7. Sin embargo, la DAO encapsulada procedente de riñón de cerdo solamente es estable cuando el pH de almacenamiento es 7.

La enzima DAO obtenida a partir de guisante puede ser una alternativa eficaz y sostenible para la elaboración de suplementos de DAO de origen vegetal y veganos. Además, debido a su estabilidad a diferentes pHs, puede ser viable su adición en alimentos.

Es necesario seguir investigando diferentes estrategias para mejorar la estabilidad de la DAO procedente de guisante y aprovechar su potencial para reducir el contenido de histamina en los alimentos.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Seguridad Alimentaria. (2022, junio 27). Intoxicación por histamina en alimentos. Aesan-Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. *alimentos*. Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/histamina.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/histamina.htm)

Archives, N., & Administration, R. (1982). *Federal Register: 47 Fed. Reg. 40397 (Sept. 14, 1982)*.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cebrián Aznárez, P., Sanz Vicente, I., Cebrián. (2018). «*Development of colorimetric strip test to the determination of biogenic amines*». Universidad de Zaragoza. <https://zaguan.unizar.es/record/76739/files/TAZ-TFG-2018-3232.pdf>

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., y Vidal-Carou, M. del C. (2020b). Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/biom10081181>

International Society of DAO Deficiency. (s. f.). *Histamina en los alimentos*. deficitdao.org. Recuperado 23 de mayo de 2023. <https://www.deficitdao.org/el-deficit-de-dao/la-histamina/histamina-en-los-alimentos/>

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

Martínez, M. P. S., Rodríguez, C. T., Sota, C., Jiménez, P. G., Viguera, A. R. G., & Martín, R. L. (2004). Influencia del pH de la uva en la calidad del vino y en la formación de aminas biógenas. *Zubía*, (16), 69-81. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2666561>

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. <https://www.medigraphic.com/pdfs/h-gral/hg-2005/hg053g.pdf>

Ortolani C, Pastorello EA. Food allergies and food intolerances. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006;20:467-83. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2005.11.010>

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

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

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

Yilun Weng, Xin Xu, Penghui Yan, Jiakang You, Xiaojing Chen, Hao Song, Chun-Xia Zhao, Enzyme encapsulation in metal-organic frameworks using spray drying for enhanced stability and controlled release: A case study of phytase, *Food Chemistry*, Volume 452, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139533>

## 7. ANEXOS

### ANEXO I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

En la siguiente tabla (Tabla 3) se observa la relación que tiene el desarrollo de una alternativa de origen vegetal para tratar la intolerancia a la histamina con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

**Tabla 3.** Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para la agenda 2030

|   | 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          |

### **ODS 3 – Salud y bienestar.**

El desarrollo de una alternativa al tratamiento actual para la intolerancia a la histamina, que presenta mayor eficacia y sostenibilidad es un importante paso hacia el logro del ODS – 3. El uso de la enzima diámetro oxidasa, extraída de legumbres, ayuda a disminuir el contenido de histamina, lo que puede mejorar notablemente la calidad de vida de quienes padecen esta condición. Además, al obtenerse a partir de ingredientes de origen vegetal, este enfoque también puede atender las preferencias de aquellos consumidores que buscan opciones más saludables y equilibradas.

### **ODS 9 – Industria, Innovación e Infraestructura.**

El desarrollo de una nueva alternativa para tratar la intolerancia a la histamina implica la promoción de la innovación y la investigación, además de la búsqueda de alternativas más sostenible y eficientes.

### **ODS 12 – Producción y consumo responsable**

Al optar por obtener la enzima DAO a partir de legumbres en lugar de la alternativa actual obtenida a partir de riñón de cerdo es una medida que apoya el ODS 12 de Producción y consumo responsable. La producción de una alternativa con materia prima vegetal tiene menor impacto ambiental ya que el sector cárnico es uno de los que más contribuye al cambio climático ya que generan un porcentaje elevado de gases de efecto invernadero.

### **ODS 13 – Acción por el clima.**

El desarrollo de esta alternativa obtenida del guisante tiene un impacto con el ODS 13 de Acción por el clima ya que utilizar una materia prima vegetal en lugar de una animal contribuye a reducir la emisión de gases de efecto invernadero, mitiga la deforestación ya que la expansión de la ganadería es una de las principales causas de la deforestación, además la producción de alimentos vegetales realiza un menor uso de recursos naturales.

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

El uso de ingredientes vegetales tiene un impacto positivo en el ODS 15 de Vida de ecosistemas terrestres ya que la ganadería industrial es responsable del 80% de la deforestación mundial.

## ANEXO II. Material suplementario

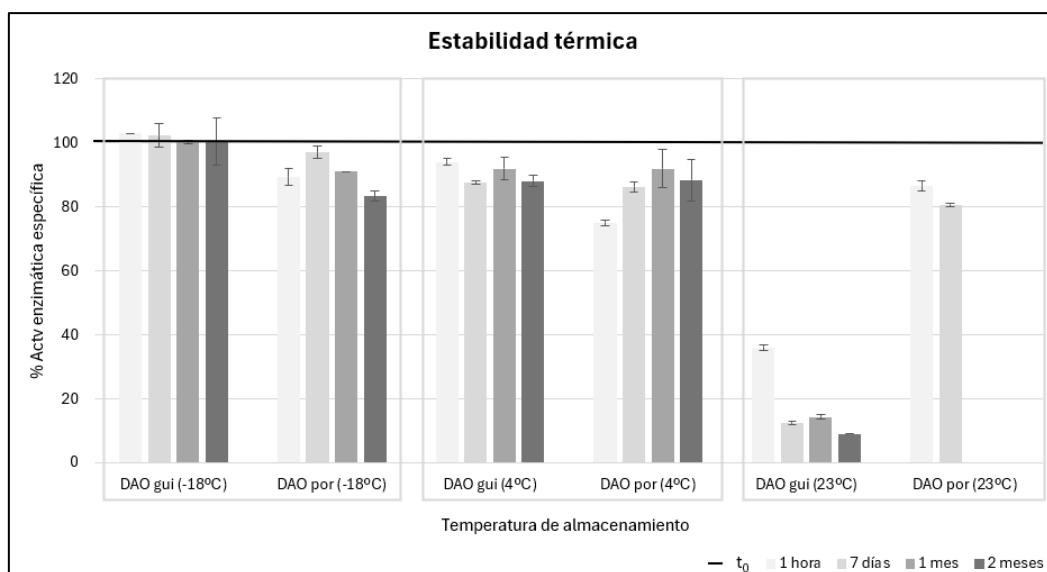
En la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos de actividad enzimática de DAO encapsulada almacenada a diferentes temperaturas y tiempo de almacenamiento.

**Tabla 4.** Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de DAO encapsulada, 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                   | 0,1027 ±0,0002                                     | 0,0941±0,0009 | 0,036±0,0008    |
|                 | 7 días                   | 0,102 ±0,003                                       | 0,0879±0,0005 | 0,01212±0,0006  |
|                 | 1 mes                    | 0,1006±0,0007                                      | 0,092±0,003   | 0,0144±0,0004   |
|                 | 2 meses                  | 0,1±0,007  | 0,088±0,002   | 0,00927±0,00007 |
| DAO de porcino  | 1 hora                   | 0,038±0,001  | 0,0323±0,0004 | 0,0374±0,0006   |
|                 | 7 días                   | 0,0421±0,0009                                      | 0,0373±0,0007 | 0,0351±0,0006   |
|                 | 1 mes                    | 0,0394±0,0001                                      | 0,039±0,002   | 0               |
|                 | 2 meses                  | 0,0360±0,0006                                      | 0,038±0,003   | 0               |

Resultados expresados en media ± desviación típica.

A continuación, se presenta los gráficos de barras que muestra los porcentajes de actividad enzimática obtenidos a lo largo del tiempo, según la fuente de DAO utilizada, en función de las distintas temperaturas de almacenamiento.



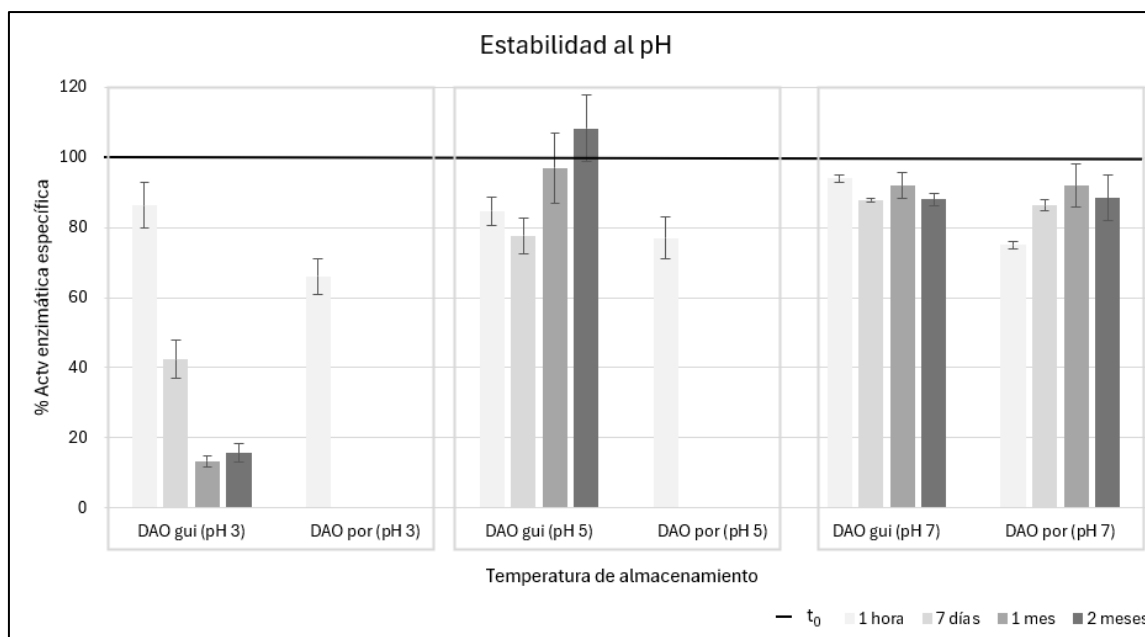
**Figura 12.** Gráfico de barras de la estabilidad térmica (-18°C, 4°C y 23°C) de la DAO de guisante (DAO gui) y DAO de porcino (DAO por), encapsuladas, durante el almacenamiento a 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses.

En la Tabla 5, se muestran los resultados obtenidos de actividad enzimática de DAO encapsulada almacenada a diferentes pH y tiempos de almacenamiento.

**Tabla 5.** Actividad enzimática específica (U/mg de proteína) de DAO encapsulada, de guisante y de porcino, almacenada a diferentes pHs (pH 3, pH5 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                   | 0,041±0,003  | 0,064±0,003   | 0,091±0,0008  |
|                 | 7 días                   | 0,02±0,003   | 0,059±0,004   | 0,085±0,0005  |
|                 | 1 mes                    | 0,0063±0,0007                                      | 0,074±0,007   | 0,089±0,003   |
|                 | 2 meses                  | 0,007±0,001  | 0,082±0,007   | 0,085±0,002   |
| DAO de porcino  | 1 hora                   | 0,00047±0,00003                                    | 0,0106±0,0008 | 0,0309±0,0004 |
|                 | 7 días                   | 0  | 0             | 0,0354±0,0009 |
|                 | 1 mes                    | 0  | 0             | 0,038±0,002   |
|                 | 2 meses                  | 0  | 0             | 0,036±0,003   |

El análisis de interacciones entre los factores fuente de DAO, pH y el tiempo de almacenamiento sobre la actividad enzimática (expresada en porcentaje de actividad residual), se muestra a continuación:



**Figura 13.** Gráfico de barras de la estabilidad al pH (pH 3, pH 5 y pH 7) de la DAO de guisante (DAO gui) y DAO de porcino (DAO por), encapsuladas, durante el almacenamiento a 1 hora, 7 días, 1 mes y 2 meses.