



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 incorporación de enzima Diamino Oxidasa en
quesos sobre el contenido en histamina

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Di Luca, Mattia

Tutor/a: Hernando Hernando, María Isabel

Cotutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados

Director/a Experimental: DUCH CALABUIG, AITANA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Título: Efecto de la incorporación de enzima Diamino Oxidasa en quesos sobre el contenido en histamina

Resumen: La histamina es una amina biógena que se produce por descarboxilación del aminoácido L-histidina por acción de la enzima L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). Los alimentos fermentados y/o curados, como el queso, tienen un sobrecrecimiento de bacterias, algunas de ellas con actividad descarboxilasa, por esta razón, suelen tener un elevado contenido en histamina. En determinados individuos, esta sustancia puede provocar una intolerancia con efectos adversos para la salud, como urticaria, dolor de cabeza y taquicardia, entre otros. Además, el consumo de histamina en cantidades superiores a 500 mg/Kg produce intoxicación. La enzima Diamino Oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6) es la encargada de degradar la histamina exógena, es decir, la que llega a nuestro organismo a través del consumo de alimentos. Esta enzima actúa durante la digestión, a nivel intestinal, ya que se encuentra, principalmente, en las paredes del intestino. Un bajo contenido en DAO en el organismo puede producir una acumulación de histamina, histaminosis o intolerancia a la histamina. Para evitar este problema, en la actualidad, existen suplementos de DAO en forma de cápsulas. Sin embargo, son de origen animal (riñón de cerdo), y presentan baja actividad enzimática. Sería interesante estudiar otras posibilidades para disminuir el contenido en histamina en los alimentos.

El objetivo de este trabajo es determinar si la incorporación de DAO en queso permite disminuir el contenido en histamina. Para ello, se estudian diferentes quesos, concretamente, Roncal, Cabrales, Manchego Curado, Manchego Viejo, Roquefort, Idiazabal Ahumado, Grana Padano y Parmigiano Reggiano y se caracteriza su contenido en sal, pH, actividad de agua, humedad y contenido en histamina. Se selecciona el de mayor contenido en histamina para estudiar la efectividad de la DAO comercial de origen animal y de la DAO vegetal procedente de guisantes germinados sobre el contenido de histamina en queso.

La DAO de origen vegetal derivada de guisantes germinados mostró una mayor actividad enzimática y permitió una reducción significativamente mayor de histamina en el queso Grana Padano en comparación con la DAO de origen animal. Estos resultados podrían tener implicaciones importantes tanto en la industria alimentaria como en la protección de la salud de los consumidores, especialmente para aquellas personas sensibles a la histamina en su dieta. Este trabajo se relaciona principalmente con el ODS de la Agenda 2030: ODS 3 (Salud y bienestar)

Palabras claves: actividad enzimática, HPLC, intolerancia a la histamina, diamino oxidasa, reacción enzimática, queso.

Title: Effect of the incorporation of Diamine Oxidase enzyme in cheese's histamine content

Abstract: Histamine is a biogenic amine produced by the decarboxylation of the amino acid L-histidine through the action of the enzyme L-histidine decarboxylase (EC.4.1.1.22). Fermented and/or cured foods, such as cheese, have an overgrowth of bacteria, some of which have decarboxylase activity, and therefore, they tend to have a high histamine content. In certain individuals, this substance can cause intolerance with adverse health effects, such as hives, headaches, and tachycardia, among others. Moreover, consuming histamine in quantities higher than 500 mg/kg can lead to intoxication. The enzyme Diamine Oxidase (DAO, EC.1.4.3.6) is responsible for degrading exogenous histamine, which is the histamine that enters our body through food consumption. This enzyme acts during digestion at the intestinal level since it is mainly found in the intestinal walls. A low DAO content in the body can result in histamine accumulation, histaminosis, or histamine intolerance. Currently, DAO supplements in capsule form exist to prevent this problem. However, they are of animal origin (pig kidney) and have low enzymatic activity. It would be interesting to study other possibilities to reduce histamine content in foods.

The objective of this study is to determine if the incorporation of DAO in cheese allows for a reduction in histamine content. To achieve this, different cheeses are studied, specifically Roncal, Cabrales, Manchego Curado, Manchego Viejo, Roquefort, Idiazabal Ahumado, Grana Padano, and Parmigiano Reggiano, and their content of salt, pH, water activity, moisture, and histamine is characterized. The cheese with the highest histamine content is selected to study the effectiveness of commercial animal-derived DAO and vegetable-derived DAO from germinated peas on histamine content in cheese.

The vegetable-derived DAO from germinated peas showed higher enzymatic activity and allowed for a significantly greater reduction in histamine content in Grana Padano cheese compared to animal-derived DAO. These results could have important implications both in the food industry and in protecting the health of consumers, especially for those sensitive to histamine in their diet. This study is primarily related to SDG 3 (Good Health and Well-being) of the 2030 Agenda.

Keywords: enzymatic activity, HPLC, histamine intolerance, diamine oxidase, enzymatic reaction, cheese

Títol: Efecte de la incorporació de l'enzim Diamino Oxidasa en formatges sobre el contingut de histamina.

Resum: La histamina és una amina biogènica que es produeix per descarboxilació de l'aminoàcid L-histidina per acció de l'enzim L-histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). Els aliments fermentats i/o curats, com el formatge, tenen un sobrecreixement de bacteris, alguns d'ells amb activitat descarboxilasa, per aquesta raó, solen tindre un elevat contingut en histamina. En determinats individus, aquesta substància pot provocar una intolerància amb efectes adversos per a la salut, com urticària, mal de cap i taquicàrdia, entre altres. A més, el consum de histamina en quantitats superiors a 500 mg/kg produeix intoxicació. L'enzim Diamino Oxidasa (DAO, EC.1.4.3.6) és l'encarregat de degradar la histamina exògena, és a dir, la que arriba al nostre organisme a través del consum d'aliments. Aquest enzim actua durant la digestió, a nivell intestinal, ja que es troba, principalment, en les parets de l'intestí. Un baix contingut en DAO en l'organisme pot produir una acumulació de histamina, histaminosi o intolerància a la histamina. Per a evitar aquest problema, en l'actualitat, existeixen suplementes de DAO en forma de càpsules. No obstant això, són d'origen animal (ronyó de porc), i presenten baixa activitat enzimàtica. Seria interessant estudiar altres possibilitats per a disminuir el contingut en histamina en els aliments.

L'objectiu d'aquest treball és determinar si la incorporació de DAO en formatge permet disminuir el contingut en histamina. Per a això, s'estudien diferents formatges, concretament, Roncal, Cabrales, Manchego Curat, Manchego Vell, Roquefort, Idiazabal Fumat, Grana Padano i Parmigiano Reggiano i es caracteritza el seu contingut en sal, pH, activitat d'aigua, humitat i contingut en histamina. Es selecciona el de major contingut en histamina per a estudiar l'efectivitat de la DAO comercial d'origen animal i de la DAO vegetal procedent de pèsols germinats sobre el contingut de histamina en formatge.

La DAO d'origen vegetal derivada de pèsols germinats va mostrar una major activitat enzimàtica i va permetre una reducció significativament major de histamina en el formatge Grana Padano en comparació amb la DAO d'origen animal. Aquests resultats podrien tindre implicacions importants tant en la indústria alimentària com en la protecció de la salut dels consumidors, especialment per a aquelles persones sensibles a la histamina en la seua dieta. Aquest treball està relacionat principalment amb l'ODS 3 (Salut i benestar) de l'Agenda 2030.

Paraules clau: activitat enzimàtica, HPLC, intolerància a la histamina, diamino oxidasa, reacció enzimàtica, formatge

Autor/a: Di Luca, Mattia

Tutor/a: Hernando Hernando, María Isabel

Cotutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados

Director/a Experimental: Duch Calabuig, Aitana

Valencia, julio de 2023

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo. Han sido unos meses llenos de aprendizaje y no podría haberlo logrado sin vuestro apoyo.

En especial, quiero agradecer a mis tutoras, Isabel Hernando y Amparo Quiles, quienes me han guiado desde el primer momento y me han dado apoyo incondicional en todas las ocasiones. También quiero agradecer a Ana Fuentes por su ayuda, asegurándose siempre de que todo saliera bien.

A Aitana, directora experimental, por acompañarme en el laboratorio y ayudarme en todo momento, especialmente cuando los resultados no eran los esperados. Su presencia ha sido fundamental.

A mis amigos y compañeros de clase, con quienes he compartido estos años, les agradezco por enseñarme la España que solo se puede conocer viviendo. También quiero agradecer a mis profesores y a toda la universidad por la enseñanza, la pasión y, sobre todo, la amabilidad que han demostrado.

A mi familia, a pesar de la distancia, les agradezco por estar siempre presente, apoyándome e incentivándome a dar lo mejor. Nunca dudaron de mí y siempre estuvieron ahí cuando los necesitaba. Gracias por escucharme en los momentos difíciles y en los momentos de éxito.

Por último, y no menos importante, agradezco a Norma, mi compañera en todo este camino, por creer en mí y apoyarme siempre. ¡Nadie más que tú sabe lo importante que has sido!

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	La histamina.....	1
1.2	Presencia de histamina en alimentos.....	1
1.3	Importancia de la DAO.....	4
1.4	DAO de origen vegetal.....	5
2	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	6
2.1	Objetivo general.....	6
2.2	Objetivos específicos.....	6
2.3	Plan de trabajo.....	6
3	MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1	Materia prima.....	8
3.2	Caracterización de los quesos.....	9
3.2.1	Determinación del contenido en sal.....	9
3.2.2	Determinación del pH.....	10
3.2.3	Determinación de la actividad de agua.....	10
3.2.4	Determinación del contenido en humedad.....	10
3.3	Determinación del contenido en histamina por HPLC.....	10
3.3.1	Obtención del extracto.....	10
3.3.2	Derivatización.....	11
3.3.3	Determinación del contenido en histamina.....	11
3.4	Determinación de la actividad enzimática y del contenido en proteína de la DAO comercial de origen animal procedente de porcino y de la DAO vegetal procedente de guisantes.....	13
3.4.1	Preparación de los extractos enzimáticos.....	13
3.4.2	Determinación de la actividad enzimática.....	13
3.4.3	Contenido en proteína.....	14
3.5	Determinación del impacto de la diamino oxidasa sobre el contenido de histamina en queso.....	15
3.6	Análisis estadístico.....	15
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1	Caracterización de los quesos.....	16
4.2	Contenido en histamina.....	17
4.3	Determinación de la actividad enzimática de la DAO comercial de origen animal procedente de porcino y de la DAO vegetal procedente de guisantes.....	18
4.4	Determinación del impacto de la DAO animal sobre el contenido de histamina en queso.....	19
4.5	Determinación del impacto de la DAO vegetal sobre el contenido de histamina en queso.....	20
5	CONCLUSIONES	23
6	BIBLIOGRAFIA	24
7	ANEXOS	28
	ANEXO I. Objetivos de desarrollo sostenibles.....	28
	ANEXO II. Cromatogramas DAO vegetal y muestra GP.....	30
	ANEXO III. Cromatogramas DAO animal y muestra GP.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción enzimática que genera histamina a partir de histidina (Huang et al., 2018).	3
Figura 2. Degradación de histamina por la enzima DAO (Comas-Basté et al., 2020b).....	4
Figura 3. Etapa de derivatización en Eppendorf con el volumen final ajustado a 2,5 mL.....	11
Figura 4. Cromatografo LaChrom Elite® (VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvania, EEUU.)	12
Figura 5. Reacción de derivatización (Ohtsubo et al., 2014)	12
Figura 6. Reacción enzimática (modificada a partir de Cebrián et al., (2018)).	14
Figura 7. Contenido relativo en histamina en sistemas modelo (%) empleando dos ratios enzima/sustrato (0,5/0,15 y 5/0,15 mg/mg) de extracto de DAO comercial durante la reacción enzimática	19
Figura 8. Contenido relativo en histamina en el queso Grana Padano con DAO animal con y sin agua. Ambos ensayos se realizaron con la mismo ratio enzima/sustrato (5/0,15).....	20
Figura 9. Contenido relativo en histamina en queso Grana Padano (GP) tras la adición de DAO vegetal.	21
Figura 10. Patrón histamina 25ppm analizado para la DAO vegetal	30
Figura 11. Cromatograma de la muestra control GP “con agua”	31
Figura 12. Cromatograma de la muestra GP “con agua” de DAO vegetal con ratio enzima/sustrato 5/0,15.....	31
Figura 13. Cromatograma de la muestra control GP “sin agua”	32
Figura 14. Cromatograma de la muestra GP “sin agua” de DAO vegetal con ratio enzima/sustrato 5/0,15.....	32
Figura 15. Patrón histamina 25ppm analizado para la DAO comercial.....	33
Figura 16. Cromatograma de la muestra control GP “sin agua”	33
Figura 17. Cromatograma de la muestra GP “sin agua” de DAO animal con ratio enzima/sustrato 5/0,15.....	34
Figura 18. Cromatograma de la muestra control GP “con agua”	34
Figura 19. Cromatograma de la muestra GP “con agua” de DAO animal con ratio enzima/sustrato 5/0,15.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de histamina en queso (Roig-Sagués et al., 2002).	2
Tabla 2. Tipo de leche y periodo de maduración de los quesos. Datos facilitados por los fabricantes. Roncal (RO), Manchego curado (MC), Manchego viejo (MV), Cabrales (CA), Idiazabal ahumado (ID), Grana Padano (GP), Parmigiano Reggiano (PR) y Roquefort (RQ).....	8
Tabla 3. Composición de los quesos. Datos facilitados por los fabricantes. Roncal (RO), Manchego curado (MC), Manchego viejo (MV), Cabrales (CA), Idiazabal ahumado (ID), Grana Padano (GP), Parmigiano Reggiano (PR) y Roquefort (RQ).....	8
Tabla 4. Contenido en sal, pH, actividad de agua (a_w) y humedad de los quesos Roncal (RO), Manchego curado (MC), Manchego viejo (MV), Cabrales (CA), Idiazabal (ID), Grana Padano (GP), Parmigiano Reggiano (PR) y Roquefort (RQ).	16
Tabla 5. Contenido en histamina (mg histamina/Kg queso) en los quesos Roncal (RO), Manchego curado (MC), Manchego viejo (MV), Cabrales (CA), Idiazabal (ID), Grana Padano (GP), Parmigiano Reggiano (PR) y Roquefort (RQ).	17
Tabla 6. Actividad enzimática específica (mU/mg proteína) de los extractos de DAO comercial de origen animal, procedente de riñón de cerdo y de DAO vegetal, procedente de guisantes germinados.	19
Tabla 7. Contenido en histamina en el queso GP	21
Tabla 8. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030.	28

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La histamina.

La histamina es una amina biógena que se genera en los organismos por la descarboxilación del aminoácido L-histidina, reacción catalizada por la enzima histidina descarboxilasa (EC.4.1.1.22). La presencia de histamina en el cuerpo humano puede tener un origen endógeno o exógeno. La de origen endógeno es producida por las células del propio organismo (mastocitos, basófilos, neuronas, células gástricas, ...); la de origen exógeno es la absorbida, a nivel intestinal, a través del consumo de alimentos. La histamina endógena es metabolizada por la enzima histamina N-metiltransferasa (HNMT) (EC. 2.1.1.8) que cataliza la metilación del núcleo de imidazol a metilhistamina. En cuanto a la exógena, una vez ingerida, es metabolizada en el intestino, por la enzima diamino oxidasa (DAO) (EC. 1.4.3.22) que cataliza la desaminación oxidativa del grupo amino primario a imidazol acetaldehído. Ambos productos de reacción pueden ser eliminados por la orina(Comas-Basté et al., 2020a).

La histamina es una molécula biológicamente activa con múltiples efectos en el organismo. Tiene la capacidad de estimular directamente el corazón, inducir la contracción o relajación de los músculos lisos y regular la secreción de ácido gástrico (Stratton et al., 1991). Además, cumple funciones biológicas como la contracción de las células musculares lisas en bronquios e intestino, la dilatación de los vasos sanguíneos, el aumento de la permeabilidad vascular y la estimulación de la secreción de las mucosas.

Además de estos efectos, la histamina está involucrada en diversos procesos fisiológicos y biológicos. Se la relaciona con la neurotransmisión, la modulación del sistema inmunológico (mediante la quimiotaxis de eosinófilos y neutrófilos, la producción de prostaglandinas y tromboxano B, y la supresión de la síntesis de linfocinas), la hematopoyesis, la cicatrización de heridas, la isquemia intestinal, el ritmo circadiano, y la regulación de la proliferación celular y la angiogénesis en modelos tumorales (Kovacova-Hanuskova et al., 2015). Un exceso de histamina puede tener efectos perjudiciales para la salud, como la aparición de taquicardias, arritmias, alteraciones en la presión arterial, aumento de la secreción de jugos gástricos e irritación de las fibras nerviosas nociceptivas (Kovacova-Hanuskova et al., 2015).

1.2 Presencia de histamina en alimentos

Cuando los alimentos ricos en histidina se someten a ciertas condiciones de almacenamiento, procesamiento o fermentación, algunas bacterias presentes en ellos, como el *L. buchneri* (Stratton et al., 1991), son capaces de producir la enzima histidina descarboxilasa que convierte la histidina en histamina. Algunas personas pueden ser sensibles o intolerantes a la histamina y experimentar

síntomas como enrojecimiento de la piel, picazón, congestión nasal, dolores de cabeza y trastornos digestivos cuando consumen alimentos con altos niveles de histamina. En casos más graves, el consumo de alimentos con elevadas cantidades de histamina puede producir intoxicación. Por esta razón, es muy importante conocer la concentración de esta amina en los alimentos. Una concentración de 500 mg/kg o superior puede representar un potencial riesgo para la salud (Archives & Administration, 1982; DeBeer et al., 2021). En algunos alimentos, como el pescado y algunos derivados, se han establecido límites máximos de concentración de histamina que varían dependiendo de la zona geográfica, así en Estados Unidos el límite máximo permitido es de 50 ppm, en la Unión Europea de 200 ppm mientras que en países asiáticos como, por ejemplo, Sri Lanka es de 400 ppm (DeBeer et al., 2021). En general, los alimentos que suelen contener niveles más elevados de histamina son los productos fermentados, como el queso curado, el vino tinto, los embutidos, el pescado y ciertos mariscos.

Histamina en quesos

El queso es un alimento muy consumido que puede contener altos niveles de histamina. Aunque existe una gran variabilidad en los valores encontrados (Tabla 1), los quesos curados son los que suelen presentar mayor contenido en histamina (Roig-Sagués et al., 2002).

Tabla 1. Contenido de histamina en queso (Roig-Sagués et al., 2002).

Variedad	Histamina (mg/kg)
Cabrales	60–928
Ibérico	5,7–27
Idiazabal	5,2–247
Roncal	9,6-14
Manchego	n.d.–49

Uno de los principales factores que influye en la formación de histamina en queso es el contenido en el aminoácido histidina, precursor de la histamina y sustrato de la reacción enzimática. A pesar de que la leche fresca tiene una cantidad muy pequeña de histidina libre, las proteínas lácteas pueden contener niveles significativos de este aminoácido (Stratton et al., 1991). Otro factor fundamental es la presencia de microorganismos capaces de sintetizar la enzima histidina descarboxilasa. La leche cruda es una importante fuente de bacterias descarboxilasas positivas (Calzada et al., 2013). Los enterococos y los lactobacilos hetero fermentativos y otras bacterias lácticas se consideran unas de las principales bacterias formadoras de histamina. Aunque la

mayoría de las bacterias productoras de aminas biógenas en quesos son Gram-positivas, siendo *L. buchneri* la más conocida (Roig-Sagués et al., 2002), algunas bacterias Gram-negativas también pueden estar involucradas en la formación de aminas biógenas en el queso (Díaz García, 2012).

Se ha observado que la histamina tiende a acumularse durante el proceso de maduración del queso, debido a la presencia de bacterias que ya estaban presentes en la leche y, no tanto, por contaminación durante el procesado (Stratton et al., 1991). De este modo, el contenido en histamina en quesos que proceden de leche cruda es superior al de los que proceden de leche pasteurizada. (Roig-Sagués et al., 2002). Los procedimientos de reducción bacteriana en leche, como la pasteurización, la presurización o la homogeneización a alta presión, pueden disminuir los niveles de bacterias decarboxilasas positivas (Calzada et al., 2013) y evitar la formación de histamina. Mantener altos estándares de calidad en la leche que se va a someter a un tratamiento térmico mínimo puede ser esencial para prevenir la acumulación de histamina (Roig-Sagués et al., 2002).

Una vez los microorganismos han producido la enzima histidina decarboxilasa (EC.4.1.1.22), esta cataliza la reacción de descarboxilación de la histidina y se forma como producto la histamina (Figura 1).

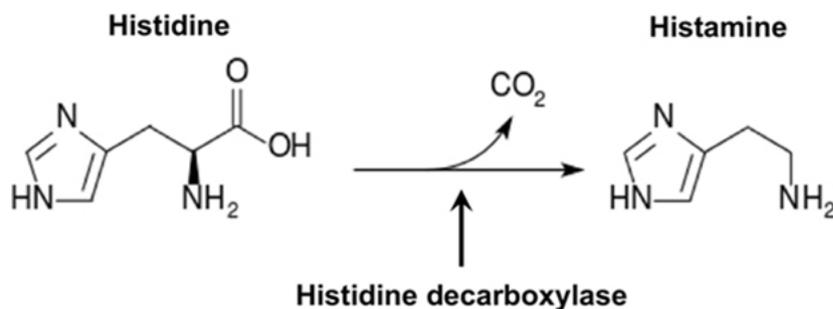


Figura 1. Reacción enzimática que genera histamina a partir de histidina (Huang et al., 2018).

Otros factores que influyen en la formación de histamina en el alimento son las propiedades fisicoquímicas del alimento, como el contenido en sal, la actividad de agua y el pH y, las condiciones del procesado del alimento (Moniente et al., 2021) que van a crear un entorno favorable o no para el desarrollo de la microbiota.

El consumo de queso ha sido la causa de diferentes casos de intoxicación por histamina (Stratton et al., 1991). El primer caso descrito ocurrió en 1967 en los Países Bajos y estuvo relacionado con el consumo de queso Gouda. Este queso se contaminó con un tipo inusual de lactobacilos, resistentes al contenido en sal del queso (Doeglas et al., 1967). La investigación orientada al

descubrimiento de nuevas metodologías que posibiliten la reducción de los niveles de histamina en alimentos podría tener importantes beneficios para la salud.

1.3 Importancia de la DAO

La enzima DAO desempeña un papel crucial en la degradación de la histamina exógena (Figura 2). Para su correcto funcionamiento, la DAO requiere de la presencia de cofactores esenciales, como las vitaminas B6 y C, así como del cobre. La proteína DAO se almacena en estructuras vesiculares y se une a la membrana plasmática de las células. Tras la estimulación, la DAO es liberada en el intestino, donde lleva a cabo la degradación de la histamina extracelular o ingerida (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015), proporcionando protección contra la histaminosis (elevados contenidos de histamina en plasma) (Fogel et al., 2007). Además, la DAO también protege al organismo de la histamina formada por las bacterias intestinales (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015).



Figura 2. Degradación de histamina por la enzima DAO (Comas-Basté et al., 2020b).

La deficiencia de DAO en el organismo tiene como consecuencia una reducción en la degradación intestinal de histamina y un aumento de su concentración en el plasma o histaminosis, lo que podría ser una de las causas de intolerancia a la histamina (Izquierdo-Casas et al., 2019). Las soluciones que se proponen en la actualidad frente a una deficiencia de DAO consisten en, o bien llevar una dieta a base de productos con baja concentración de histamina, o en tomar, antes de las comidas, suplementos que contienen extractos con enzima DAO. En ocasiones es necesario recurrir a ambas soluciones. Aunque se ha demostrado la eficacia de llevar una dieta baja en histamina (Comas-Basté et al., 2020b), no es fácil mantenerla durante mucho tiempo debido a que excluye bastantes alimentos. Por otra parte, los suplementos alimenticios que contienen DAO, generalmente, son de origen animal, proceden de riñón de cerdo y están disponibles en forma de cápsulas gastro resistentes. Estas cápsulas se liberan en el tracto intestinal y ayudan al organismo a degradar la histamina, evitando así su paso al torrente sanguíneo (Izquierdo-Casas et al., 2019). Aunque varios estudios (Comas-Basté et al., 2020b) han demostrado que el extracto comercial de DAO procedente de riñón de cerdo tiene la capacidad de degradar histamina y otras aminas

biogénicas, en algunas condiciones de reacción y diferentes matrices alimentarias, este extracto no presenta una elevada efectividad y sólo es capaz de degradar una proporción baja de histamina (Kettner et al., 2020). Por ejemplo, Naila et al., (2015) utilizaron la DAO de origen animal en Rihaakuru, una salsa fermentada de pescado característico de las Maldivas, y consiguieron degradar parte de la histamina presente en este alimento. Sin embargo, existe una notable variabilidad en la actividad enzimática de la DAO presente en los extractos de riñón porcino. Esta variabilidad depende del grado de purificación aplicado a la muestra y del sustrato de reacción utilizado en los estudios. Estos hallazgos sugieren que la eficacia de la DAO de origen animal puede verse afectada por diferentes factores y es necesario considerar cuidadosamente su aplicación.

Sería interesante encontrar fuentes alternativas a la DAO de riñón porcino que tengan elevada efectividad para disminuir los niveles de histamina exógena.

1.4 DAO de origen vegetal

Ciertas leguminosas comestibles, como la soja, los guisantes, las lentejas y los garbanzos son capaces de sintetizar la enzima DAO y se presentan como prometedoras fuentes vegetales para la obtención de extractos de DAO destinados al tratamiento de la intolerancia a la histamina (Comas-Basté et al., 2020a). La suplementación con la enzima DAO procedente de estas leguminosas podría ser una alternativa vegana y de elevada eficacia a la procedente de hígado de porcino. Comas-Basté et al., (2020a) investigaron la actividad de la DAO procedente de guisantes en sistemas modelo que resultó ser casi dos veces mayor que la de los extractos de proteína de riñón porcino. Sin embargo, no se conoce la actividad catalítica de la enzima en matrices alimentarias reales. La investigación orientada a optimizar los factores y las condiciones que influyen en la reacción enzimática catalizada por la DAO se considera de gran interés para el desarrollo de extractos de DAO de origen vegetal de alta efectividad. El uso de DAO de origen vegetal capaz de disminuir de forma eficiente los niveles de histamina procedente de alimentos podría ser una opción adecuada para diferentes grupos poblacionales de consumidores, como los veganos y vegetarianos. Estos extractos vegetales de DAO, además, cumplirían con las tendencias actuales de los consumidores que prefieren, cada vez más, consumir alimentos de origen vegetal(Comas-Basté et al., 2020a).

2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es determinar el impacto que tiene la adición de un extracto enzimático de DAO vegetal, procedente de guisantes germinados, sobre el contenido de histamina en queso.

2.2 Objetivos específicos

Para llevar a cabo el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar diferentes quesos en cuanto a su contenido en sal, pH, actividad de agua y humedad.
2. Conocer el contenido en histamina de diferentes quesos. Seleccionar el queso con un mayor contenido en histamina.
3. Determinar la efectividad de la DAO comercial de origen animal y de la DAO vegetal procedente de guisantes germinados sobre el contenido de histamina en queso.

2.3 Plan de trabajo

1. Revisión de estudios previos relacionados con la histamina y la enzima diamino oxidasa (DAO).
2. Determinación del contenido en sal, pH, actividad de agua y humedad en diferentes quesos.
3. Optimización del método para la determinación del contenido en histamina en quesos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, adaptando las variables y condiciones del análisis a la matriz de estudio.
4. Determinación por HPLC del contenido en histamina en diferentes quesos.
5. Determinación de la actividad enzimática y contenido en proteína de extracto de DAO comercial de origen animal procedente de porcino y de extracto de DAO de origen vegetal procedente de guisante germinado.
6. Optimización de los parámetros de la reacción enzimática de la DAO para la degradación de histamina en la matriz de queso.
7. Determinación del impacto de la adición de un extracto de DAO comercial de origen animal y del extracto de DAO vegetal sobre el contenido de histamina en queso.
8. Determinación del impacto de la incorporación de agua, como sistema vehiculizante de la DAO animal y vegetal, durante la reacción enzimática, sobre el contenido de histamina en queso.

9. Análisis y discusión de los resultados obtenidos

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

En este trabajo, se estudiaron quesos elaborados con leche cruda o pasteurizada y sometidos a diferentes períodos de maduración. Todos los quesos fueron adquiridos en el supermercado El Corte Inglés SA ubicado en Valencia. En la Tabla 2 se presentan los quesos estudiados; estos fueron el Roncal (RO), Manchego curado (MC), Manchego viejo (MV), Cabrales (CA), Idiazabal ahumado (ID), Grana Padano (GP), Parmigiano Reggiano (PR) y Roquefort (RQ).

Tabla 2. Tipo de leche y periodo de maduración de los quesos. Datos facilitados por los fabricantes. Roncal (RO), Manchego curado (MC), Manchego viejo (MV), Cabrales (CA), Idiazabal ahumado (ID), Grana Padano (GP), Parmigiano Reggiano (PR) y Roquefort (RQ).

Queso (fabricante)	Tipo de leche	Periodo de maduración (meses)
RO (Ronkari)	Cruda	4
MC (Don Bernardo)	Pasteurizada	4-6
MV (Don Bernardo)	Pasteurizada	6-9
CA (Pastora Mayor)	Cruda	4
ID (Belai)	Cruda	6
GP (Galbani)	Cruda	20
PR (Ferrarini)	Cruda	22
RQ (Coccinelle)	Cruda	2

Los quesos se envasaron a vacío y se almacenaron en refrigeración hasta su uso. En la Tabla 3 se presenta la composición química, aportada por el fabricante, de los quesos.

Tabla 3. Composición de los quesos. Datos facilitados por los fabricantes. Roncal (RO), Manchego curado (MC), Manchego viejo (MV), Cabrales (CA), Idiazabal ahumado (ID), Grana Padano (GP), Parmigiano Reggiano (PR) y Roquefort (RQ).

Composición (g/100g)	RO	MC	MV	CA	ID	GP	PR	RQ
Grasa	41,5	39	39	33	36	29	30	32
saturada	27,3	28	28	24	25	18	20	20
Hidratos de carbono	0	1,8	2,2	0,1	0,2	0	0	1,8
Proteínas	26,1	25	25	24	25	33	32	21
Sal	1,7	1,5	1,9	3	1,7	1,5	1,6	3,6

Para estudiar el impacto de la enzima diamino oxidasa (DAO) sobre el contenido en histamina del queso se empleó extracto de DAO vegetal obtenido a partir de polvo liofilizado de guisantes forrajeros (*Pisum sativum*) germinados. Los guisantes fueron proporcionados por la Fábrica de Piensos del Departamento de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València (UPV), germinados durante 6 días en oscuridad a una humedad del 80% y posteriormente liofilizados, triturados y tamizados para obtener un polvo fino y homogéneo. El polvo obtenido se envasó a vacío y se conservó en congelación a -80°C hasta su uso. El extracto de DAO comercial (0,05 U/mg sólido) fue proporcionado por Sigma-Aldrich y se almacenó a -20°C según las indicaciones del producto.

3.2 Caracterización de los quesos

Se determinó el contenido en sal, pH, actividad de agua y humedad de los quesos. Es importante conocer el entorno donde se va a llevar a cabo la reacción enzimática de la DAO. Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado.

3.2.1 Determinación del contenido en sal

El contenido en sal de los quesos se determinó según el siguiente procedimiento. Se introdujo en tubos Falcon estériles de 50 mL entre 1 y 5 g (W_1) de queso. A continuación, se añadieron 25 mL (V_1) de agua Milli-Q y la mezcla se homogeneizó en un UltraTurrax (IKA Ultraturax T25 Basic, Staufen, DE) durante 1 min a 6000 rpm. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 8000 rpm y 20°C durante 10 min. El sobrenadante se recuperó, se filtró empleando papel de filtro y se diluyó con agua Milli-Q a razón de 1:20 (extracto:agua). Esta disolución se homogeneizó utilizando un vortex.

El contenido de iones cloruro de esta disolución se determinó empleando un equipo Sherwood Chloride Analyser (Sherwood Scientific Ltd, Cambridge, UK). El método utilizado por este equipo se basa en una titulación coulométrica, en la cual, los iones de plata, como reactivo, se generan de manera precisa y cuantitativa en el momento del análisis al pasar una corriente constante entre electrodos. El punto final se determina cuando los iones de plata en exceso causan un cambio en la conductividad, que es detectado por los electrodos del detector.

Para calcular el contenido en sal de los quesos, se utilizó la siguiente Ecuación [1].

$$Sal (\%) = [Cl] \left(\frac{mg}{L} \right) * \frac{Pm_s}{Pm_{Cl}} * \frac{V_{1(L)}}{W_1(kg)} * D_1 * 100 \quad [1]$$

Donde:

- P_{m_s} corresponde al peso molecular de NaCl 58,5 g/mol
- $P_{m_{Cl}}$ corresponde al peso molecular de Cl 35,5 g/mol
- V_1 corresponde al volumen de la disolución expresado en litros
- W_1 corresponde al peso de la muestra expresado en kilos
- D_1 corresponde a la dilución utilizada, en este caso 20

3.2.2 Determinación del pH

Para determinar el pH de los quesos se utilizó un pH-metro BASIC 20+ (Crison, Hach Lange Spain, SLU, Barcelona) equipado con una sonda de vidrio (combinada con un punzón). Para ello, se tomó un bloque de queso de 10x5x0,5 cm y se introdujo la sonda.

3.2.3 Determinación de la actividad de agua

Para determinar la actividad del agua (a_w) de los quesos se empleó un equipo WaterLab a_w (Steroglass S.r.l., San Martino in Campo, Perugia, IT).

3.2.4 Determinación del contenido en humedad

Para la determinación del contenido en humedad de los quesos, se empleó el método oficial de la AOAC 926.08 (AOAC, 1997). Para ello, se colocó entre 2 y 3 g de queso triturado manualmente en recipientes de metal que contenían arena, previamente secados en una estufa a 100°C durante 2 h (W_1) y mantenidos en un desecador. Los recipientes junto con las muestras fueron pesados (W_2) y se introdujeron en un horno de vacío VACIOTEM-T (J.P. SELECTA, Abrera-Barcelona) a 100 mm Hg (13.3 kPa) de presión y 100°C hasta alcanzar un peso constante, aproximadamente, 4 h. Tras finalizar el secado, se retiraron los recipientes del horno, se mantuvieron en un desecador y se volvieron a pesar para obtener el peso final (W_3). El contenido en humedad se calculó con la Ecuación [2].

$$Humedad (\%) = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100 \quad [2]$$

3.3 Determinación del contenido en histamina por HPLC

3.3.1 Obtención del extracto

Para obtener el extracto se empleó el protocolo utilizado por Joosten & Olieman, (1986) y modificado por Botello-Morte et al., (2022). En primer lugar, se pesaron 5 g de la muestra

triturada en un tubo Falcon de 50 mL y se agregaron 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v). La mezcla se homogeneizó utilizando un UltraTurrax (IKA Ultraturrax T25 Basic, Staufen, DE) durante 2 min a 4000 rpm. A continuación, se centrifugó a 9500 rpm y una temperatura de 20°C durante 10 min. El sobrenadante resultante se filtró utilizando un filtro de membrana en microfibra de 1,2 µm de tamaño de poro y se congeló.

3.3.2 Derivatización

Para llevar a cabo la etapa de derivatización se tomó como base el protocolo descrito por Vinci et al., (2021) y se realizaron una serie de modificaciones con el objetivo de optimizar el protocolo para la muestra variando las condiciones de temperatura, concentración de dansilo y volumen de NaOH. El protocolo optimizado consistió en tomar 500 µL del sobrenadante y agregar 175 µL de NaOH 2N y 150 µL de solución saturada de NaHCO₃ para ajustar el pH entre 10 y 12. Además, se agregaron 500 µL de solución de cloruro de dansilo (14 mg/ml de cloruro de dansilo LiChropur™, con una pureza ≥ 99.0% en acetona de grado HPLC). A continuación, la mezcla se agitó en un vortex y se introdujo en una estufa a 45°C en oscuridad durante 20 min. Para detener la reacción de derivatización, se añadieron 50 µL de NH₄OH al 25% v/v y posteriormente, se enfriaron en refrigeración a 4°C durante 5 min. Finalmente, se ajustó el volumen final a 2,5 mL utilizando acetonitrilo de grado HPLC (Figura 3).

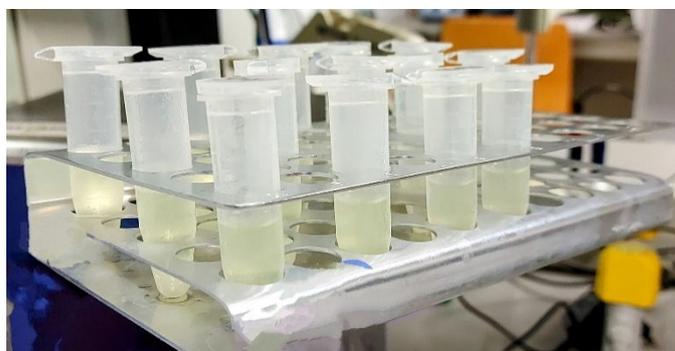


Figura 3. Etapa de derivatización en Eppendorf con el volumen final ajustado a 2,5 mL

3.3.3 Determinación del contenido en histamina

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



Figura 4. Cromatografo LaChrom Elite® (VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvania, EEUU.)

La fase móvil consistió en agua ultrapura/acetronitrilo (50/50, v/v). El volumen de inyección de la muestra fue de 50 μ L y la velocidad de flujo fue de 1,2 mL/min. Para la cuantificación de histamina en las muestras se preparó una recta de calibrado empleado patrones de concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 y 250 mg/L. Estas disoluciones patrón se prepararon a partir de una disolución madre de histamina de 1000 mg/L, la cual se preparó disolviendo 165,6 mg de dihidrocloruro de histamina (Sigma Aldrich) en 100 mL de agua Milli-Q. Se obtuvo una recta de calibración con R^2 de 0,9995. En la Figura 5 se puede observar el analito analizado por el equipo de HPLC derivatizado a partir de la histamina con el cloruro de dansilo.

Se realizó la optimización de la determinación, adaptando el gradiente de elución.

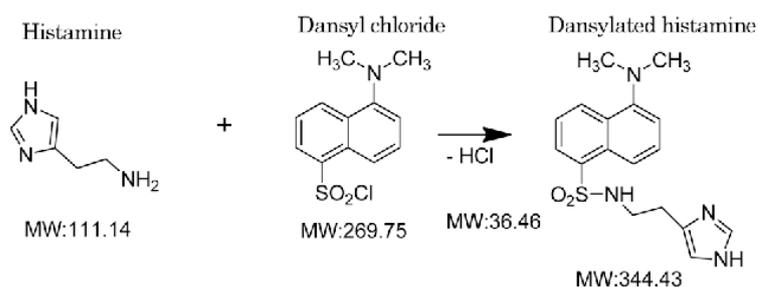


Figura 5. Reacción de derivatización (Ohtsubo et al., 2014)

3.4 Determinación de la actividad enzimática y del contenido en proteína de la DAO comercial de origen animal procedente de porcino y de la DAO vegetal procedente de guisantes

3.4.1. Preparación de los extractos enzimáticos

Para preparar las disoluciones de los extractos de DAO comercial se diluyó 1g del extracto en 5 mL de tampón de ácido piperazidina etanosulfónico 25mM (tampón PIPES, pH 7,2). Los extractos diluidos se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis y utilización.

Los extractos enzimáticos de DAO vegetal se obtuvieron a partir de polvos de brotes de guisante liofilizados. Para ello, se pesaron en tubos de centrifuga 4 g de polvo y se añadieron 12 mL de tampón fosfato (0,07M; pH 6,5) con glicerol (100 mL de glicerol /L tampón). El tampón fosfato se preparó a partir de fosfato diácido de potasio (0,07M) y fosfato disódico (0,07 M). Los tubos con la muestra y el tampón se mantuvieron durante 30 min en agitación a 4°C y, a continuación, se sometieron a centrifugación a 10000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se recogió en un matraz de 50 mL y se mantuvo a 4°C. A el pellet se le añadieron de nuevo 12 mL de tampón fosfato con glicerol y se sometió al mismo procedimiento de agitación y centrifugación a 4°C. Este proceso se repitió un total de 3 veces. El contenido del matraz, con el sobrenadante obtenido de las 3 repeticiones, se enrasó a 50 mL con la disolución tampón y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis y utilización (Yang et al., 2012).

3.4.2. Determinación de la actividad enzimática

El protocolo de determinación de la actividad enzimática utilizado se basa en una serie de reacciones redox que producen una señal analítica (cambio de coloración), fácilmente detectable, debido al cambio del estado de oxidación de una de las sustancias (DA-67), que permite relacionar la cantidad de sustrato degradado (histamina) por acción de la enzima DAO, con el cambio de coloración (Cebrián et al., 2018). El colorante empleado recibe el nombre de DA-67 y es incoloro en su forma reducida, pero, una vez oxidado, produce un color azulado, cuyo máximo de absorbancia es detectable en el espectrofotómetro a 668 nm. La reacción enzimática global se divide en dos reacciones en serie (Figura 6).

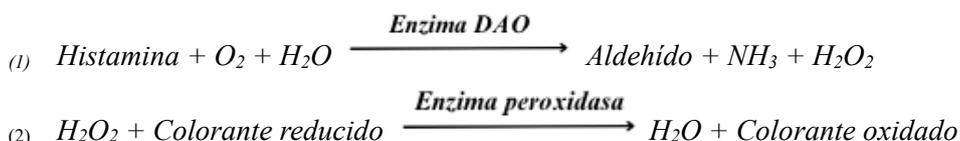


Figura 6. Reacción enzimática (modificada a partir de Cebrián et al., (2018)).

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

La actividad enzimática de la DAO comercial procedente de riñón de cerdo y de la DAO vegetal procedente de guisantes germinados se determinó utilizando el ensayo enzimático colorimétrico con DA-67 (Kettner et al., 2020). Para ello, la reacción se llevó a cabo en una disolución que contenía, 726 μL de reactivo DA-67 50 μM (en tampón PIPES 25 mM; pH 7.2) y 750 μL de una disolución de histamina 1 mM (en tampón PIPES 25 mM; pH 7.2) que se incubó a 37°C durante 10 min. A continuación, se añadieron 24 μL de peroxidasa (266 unidades/mL) y 50 μL de extracto de DAO (comercial o vegetal) y se incubó a 37°C durante 10 min. La adición de 50 μL de dietilditiocarbamato de sodio (30 mM) detuvo el proceso. La absorbancia se midió a 668 nm después de la centrifugación (10000 g, 3 min, 20°C). Para las referencias, se utilizó el tampón PIPES 25 mM, pH 7.2 en lugar de la disolución de histamina. Esta medida se realizó con el fin de evitar posibles interferencias de aminas biógenas, diferentes de la histamina, que pudieran estar presentes en los extractos. La medida de absorbancia de cada referencia se restó a la medida de absorbancia de cada muestra.

La actividad enzimática se calculó con ayuda de una recta de calibrado. Para la recta se utilizaron disoluciones de H_2O_2 que oscilaban entre 0.5 y 10 nmol/mL.

La actividad enzimática específica de la diamino oxidasa se expresó como mU/mg de proteína. Las unidades enzimáticas (U) se definen como los μmoles de sustrato degradado por minuto de reacción.

3.4.3 Contenido en proteína

El contenido en proteína se determinó para poder conocer la actividad enzimática específica de las muestras. De esta forma, es posible referenciar la actividad enzimática de la DAO con respecto a la cantidad de proteína existente en dicha muestra. El protocolo utilizado para conocer la cantidad de proteína presente en las muestras fue el método de Bradford. Se trata de una técnica colorimétrica basada en la medida de la variación de absorbancia debida al cambio de color en la disolución. Este cambio ocurre cuando existe una interacción entre las proteínas y el reactivo colorante, que se prepara a partir de Coomassie G-250. La disolución colorada de Coomassie

tiene un color marrón rojizo y al reaccionar con la proteína cambia a color azulado (Bradford, 1976).

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

La reacción se llevó a cabo al mezclar 0,1 mL de muestra proteica con 1 mL de disolución de Coomassie, y se dejó actuar, en oscuridad, durante 2 min. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

La recta de calibrado se preparó con diferentes cantidades conocidas de proteína de albúmina de suero bovina (BSA) que oscilaron entre 0 y 10 mg/mL.

3.5 Determinación del impacto de la diamino oxidasa sobre el contenido de histamina en queso

Para conocer qué cantidad de DAO mejoraba la degradación del contenido en histamina, se realizaron ensayos en sistemas modelo empleando la misma cantidad de sustrato (histamina en una concentración de 86 mg/L, valor similar al detectado en queso GP) y dos cantidades diferentes de extracto de DAO comercial para obtener dos ratios enzima/sustrato: 0,5/0,15 y 5/0,15 (mg/mg). Para llevar a cabo la reacción enzimática se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.4.2. y se determinó la degradación del contenido en histamina por HPLC según se explica en el apartado 3.3.3.

Para determinar el impacto de la adición de DAO sobre el contenido de histamina en queso, la reacción enzimática se llevó a cabo a partir de 2,5 g de queso GP rallado que se introdujeron en tubos Falcon de 50 mL. Una vez atemperada la muestra a 37°C durante 10 min, se añadieron 2,5 mL de extracto enzimático de DAO. En el caso de las determinaciones con DAO comercial, se empleó un ratio enzima/sustrato de 5/0,15 (mg/mg) mientras que, para las determinaciones con DAO vegetal, se emplearon dos ratios enzima/sustrato 0,5/0,15 y 5/0,15 (mg/mg). A continuación, la mezcla se incubó a 37°C durante 10 min. Transcurrido el tiempo de reacción, se congelaron las muestras a -80°C hasta su análisis por HPLC. Además, para estudiar la simulación de la ingesta de queso (25 g) con un vaso de agua (200 mL), la reacción enzimática se llevó a cabo del mismo modo, pero, añadiendo a los 2,5 g de queso 20 mL de agua.

3.6 Análisis estadístico

La evaluación estadística de los resultados se realizó utilizando el programa Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Technologies Inc., EE. UU.). Se aplicó un análisis de varianza

(ANOVA) para cada ensayo con el objetivo de determinar posibles diferencias significativas. Para identificar las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, se utilizó el método conocido como Least Significant Difference (LSD), con un nivel de confianza del 95% (p -valor $< 0,05$).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de los quesos

Los resultados obtenidos en las determinaciones del contenido en sal, pH, actividad de agua (a_w) y humedad de los quesos estudiados en este trabajo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Contenido en sal, pH, actividad de agua (a_w) y humedad de los quesos Roncal (RO), Manchego curado (MC), Manchego viejo (MV), Cabrales (CA), Idiazabal (ID), Grana Padano (GP), Parmigiano Reggiano (PR) y Roquefort (RQ).

	Sal (g NaCl/100g)	pH	a_w	Humedad (g agua/100g)
RO	1,26 ± 0,05	5,67 ± 0,17	0,921 ± 0,005	22,82 ± 1,60
MC	1,59 ± 0,10	5,41 ± 0,02	0,937 ± 0,001	30,63 ± 0,74
MV	2,10 ± 0,29	5,23 ± 0,18	0,919 ± 0,002	28,32 ± 0,63
CA	3,19 ± 0,21	5,67 ± 0,17	0,902 ± 0,001	36,69 ± 0,48
ID	1,42 ± 0,06	5,37 ± 0,05	0,949 ± 0,001	33,17 ± 0,23
GP	1,65 ± 0,07	5,31 ± 0,12	0,929 ± 0,003	32,24 ± 0,56
PR	1,72 ± 0,21	5,42 ± 0,08	0,923 ± 0,005	31,56 ± 0,26
RQ	2,77 ± 0,04	6,37 ± 0,04	0,914 ± 0,003	38,55 ± 0,54

Resultados expresados en media ± desviación típica.

En cuanto al contenido en sal, se pudo observar que los valores encontrados en los quesos fueron similares a los indicados por el fabricante. El queso que presentó mayor contenido fue el Cabrales (CA) con una concentración de sal de 3,19% ± 0,21 y el que presentó menor contenido el Roncal (RO) con una concentración de 1,26% ± 0,05 g NaCl/100g.

El contenido en sal de la matriz afecta a la formación de histamina producida por bacterias, como la *L.buchneri* (de A. Møller et al., 2021), uno de los principales microorganismos responsables de la formación de histamina en quesos. El contenido en sal de la matriz también puede influir en la actividad de la diamino oxidasa (DAO). Según Naila et al., (2012), en matrices con concentraciones de sal de hasta un 3%, la actividad de la DAO permitió obtener una importante reducción del contenido en histamina.

Los valores de pH de los quesos estudiados en este trabajo oscilaron entre 5,23 y 6,37, siendo el queso Manchego Viejo (MV) el que presentó el valor más bajo y el Roquefort (RQ) el más elevado. El pH es un factor clave en la formación de histamina, ya que, afecta a la actividad de las enzimas descarboxilasas, responsables de la producción de histamina, que son sintetizadas por bacterias presentes en el queso (Moniente et al., 2021). El pH también es un factor que influye en la actividad enzimática de la DAO. En algunos trabajos (Kettner et al., 2020; Naila et al., 2012) se observó que tanto en sistemas modelo como en sistemas reales hay una alta degradación de histamina a pHs entre 6 y 7,2. Kettner et al., (2022) observó que la DAO alcanzaba valores de actividad más elevados cuando el pH de reacción era de 7,2.

Todos los quesos estudiados presentaron altas a_w , con valores superiores a 0,9. El nivel de actividad de agua (a_w) es un factor clave que generalmente influye en la conservación del queso y ayuda a prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos en este alimento (Moniente et al., 2022). Elevados valores de a_w en los quesos favorecen el crecimiento de microorganismos no deseados, como bacterias patógenas, levaduras y mohos (Esener et al., 1981), mientras que bajos valores de a_w pueden inhibir su crecimiento. Además, la a_w influye en la actividad enzimática y en la estabilidad de las enzimas, especialmente, en su resistencia a la desnaturalización térmica. Una alta a_w puede conferir mayor estabilidad a las enzimas, protegiéndolas de la desnaturalización, y aumentar su actividad enzimática (Miyawaki et al., 2016).

En cuanto al contenido en humedad, los valores oscilaron entre $22,82 \pm 1,60$ y $38,55 \pm 0,54$ g agua/100g. Los quesos azules, como el RQ y CA presentaron los mayores valores. El contenido en humedad de los quesos depende de varios factores, por ejemplo, de la duración del periodo de maduración y de las condiciones en las que tiene lugar este proceso.

4.2 Contenido en histamina

Los resultados obtenidos en las determinaciones del contenido en histamina en los quesos estudiados en este trabajo se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Contenido en histamina (mg histamina/Kg queso) en los quesos Roncal (RO), Manchego curado (MC), Manchego viejo (MV), Cabrales (CA), Idiazabal (ID), Grana Padano (GP), Parmigiano Reggiano (PR) y Roquefort (RQ).

Quesos	Histamina (mg histamina/kg queso)
RO	$14,05^d \pm 0,40$

MC	N.D.
MV	N.D.
CA	55,85 ^b ± 3,85
ID	9,82 ^c ± 0,18
GP	70,66 ^a ± 2,44
PR	38,32 ^c ± 0,60
RQ	N.D.

Resultados expresados en media ± desviación típica. N.D.: no detectado. Letras diferentes como superíndices indican diferencias significativas

Todos los quesos estudiados presentaron contenidos en histamina significativamente diferentes ($p < 0,05$). El queso GP fue el que presentó mayor contenido, seguido del CA, PR y RO. El ID presentó los menores contenidos en histamina. Estos valores son similares a los encontrados en bibliografía (Roig-Sagués et al., 2002). En los quesos elaborados con leche pasteurizada no se detectó histamina. El tratamiento térmico elimina los microorganismos capaces de sintetizar la enzima descarboxilasa. El queso RQ, a pesar de estar elaborado con leche cruda, tampoco presentó un contenido en histamina detectable, esto puede estar relacionado con su periodo de maduración que es de 2 meses, más corto que el de los otros quesos.

4.3 Determinación de la actividad enzimática de la DAO comercial de origen animal procedente de porcino y de la DAO vegetal procedente de guisantes

En la Tabla 6 se muestran los valores de actividad enzimática específica obtenidos en los dos extractos de DAO, comercial (animal) y vegetal. Para ello, la reacción enzimática se realizó en un sistema modelo con una concentración de sustrato histamina similar a la presente en queso GP. La actividad enzimática específica se expresó en U/mg proteína, lo que permitió comparar actividades enzimáticas de materiales y extractos de diferente origen, ya que tiene en cuenta la cantidad de proteína presente en los distintos extractos. El contenido de proteína en los extractos de DAO comercial (procedente de riñón de cerdo) y DAO vegetal (procedente de guisantes germinados) determinada por el método de Bradford fue de 0,5 mg proteína /mg extracto y de 0,1 mg proteína /mg extracto, respectivamente.

La DAO vegetal presentó valores de actividad enzimática específica significativamente ($p < 0,05$) más elevados que la comercial (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad enzimática específica (mU/mg proteína) de los extractos de DAO comercial de origen animal, procedente de riñón de cerdo y de DAO vegetal, procedente de guisantes germinados.

Muestra	Actividad enzimática (mU/mg proteína)
DAO comercial	21,4 ^b ± 1,2
DAO vegetal	97,5 ^a ±0,8

Resultados expresados en media ± desviación típica. Letras diferentes como superíndices indican diferencias significativas

4.4 Determinación del impacto de la DAO animal sobre el contenido de histamina en queso

Tal y como se describe en el apartado de material y métodos, para conocer qué cantidad de DAO mejoraba la degradación del contenido en histamina, se realizaron ensayos en un sistema modelo de histamina utilizando DAO de origen porcino. Adicionalmente, para establecer una ratio enzima (mg)/sustrato (mg) capaz de degradar la histamina de forma efectiva durante el transcurso de la reacción enzimática, se emplearon dos ratios diferentes, 0,5/0,15 y 5/0,15, de manera que la reacción se llevó a cabo siempre con la misma cantidad de sustrato (histamina, en una cantidad similar a la cantidad detectada en la matriz de queso GP) y dos cantidades diferentes de extractos de DAO comercial porcina. Cuando la reacción enzimática se llevó a cabo con la mayor ratio enzima/sustrato se obtuvieron valores significativamente ($p < 0,05$) superiores de reducción del contenido en histamina (Figura 7).

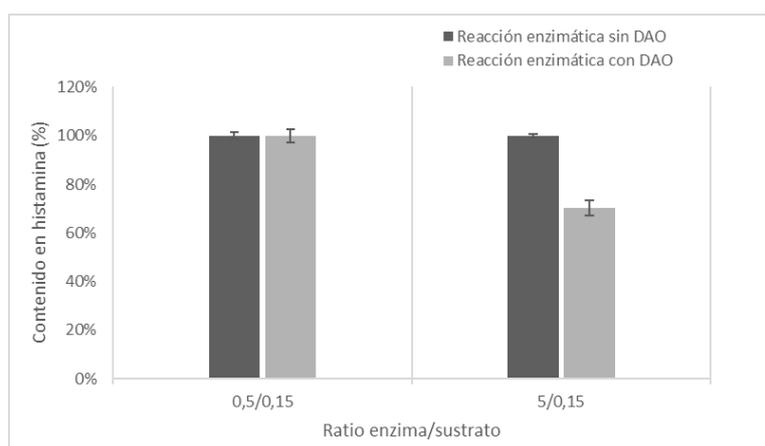


Figura 7. Contenido relativo en histamina en sistemas modelo (%) empleando dos ratios enzima/sustrato (0,5/0,15 y 5/0,15 mg/mg) de extracto de DAO comercial durante la reacción enzimática

Los resultados obtenidos mostraron que cuando se empleó la ratio inferior (0,5/0,15), la reducción en el contenido en histamina no fue significativa mientras que cuando se empleó la ratio superior, la reducción fue del 30%.

Estos resultados se tomaron como punto de partida para llevar a cabo la reacción enzimática en el queso Grana Padano empleando DAO animal. En esta reacción se empleó una ratio enzima (mg)/sustrato (mg) de 5/0,15, por ser la que produjo una mayor reducción de contenido en histamina en el sistema modelo.

En la Figura 8 se muestran los resultados del contenido relativo en histamina obtenido después de que la reacción enzimática se llevara a cabo en el queso GP con DAO comercial procedente de riñón de cerdo, sin y con la incorporación de agua en el sistema.

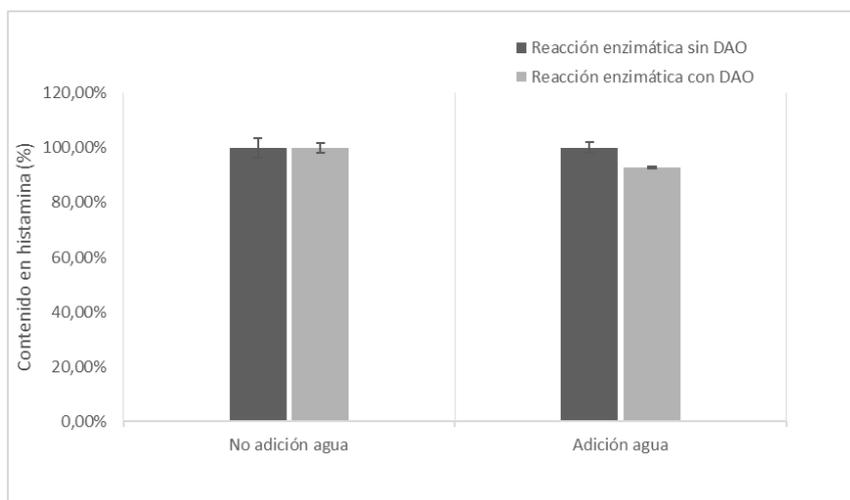


Figura 8. Contenido relativo en histamina en el queso Grana Padano con DAO animal con y sin agua. Ambos ensayos se realizaron con la mismo ratio enzima/sustrato (5/0,15)

Cuando la reacción enzimática se llevó a cabo sin la adición de agua no se observó reducción en el contenido en histamina. La concentración de histamina determinada en el queso fue de $66,96 \pm 1,22$ mg/kg sin que se encontraran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores obtenidos con presencia o no de DAO. Sin embargo, cuando se agregó agua a la reacción enzimática se produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) del $7,26\% \pm 0,23$ en el contenido de histamina del queso. Los valores de contenido en histamina fueron de $63,59 \pm 0,15$ mg/kg cuando la reacción tuvo lugar en presencia de DAO y de $68,57 \pm 1,26$ mg/kg sin presencia de la enzima.

4.5 Determinación del impacto de la DAO vegetal sobre el contenido de histamina en queso

Para estudiar el impacto de la catálisis de la DAO vegetal procedente de guisantes, la reacción enzimática se llevó a cabo empleando como sustrato el queso GP y se estudiaron dos ratios diferentes enzima/sustrato (0,5/0,15 y 5/0,15 (mg/mg)). Esta reacción se realizó sin y con adición de agua. En la Tabla 7 se presentan los contenidos en histamina determinados por HPLC.

Tabla 7. Contenido en histamina en el queso GP

	Muestra	Contenido en histamina (mg/kg)
Reacción enzimática sin adición de agua	Queso GP (control)	85,79 ± 4,01
	Ratio enzima(mg)/sustrato(mg) 0,5/0,15	82,83 ± 1,23
	Ratio enzima(mg)/sustrato(mg) 5/0,15	61,05 ± 0,15
Reacción enzimática con adición de agua	Queso GP (control)	83,84 ± 1,12
	Ratio enzima(mg)/sustrato(mg) 0,5/0,15	61,44 ± 1,04
	Ratio enzima(mg)/sustrato(mg) 5/0,15	61,50 ± 1,46

Resultados expresados en media ± desviación típica.

Cuando la reacción enzimática se llevó a cabo empleando extracto enzimático vegetal procedente de guisantes, con una ratio enzima/sustrato de 0,5/0,15 y presencia de agua se pudo observar (Figura 9) una reducción significativa ($p < 0,05$) del contenido en histamina en GP del 28,84% ± 0,17. Sin embargo, no se obtuvo reducción significativa ($p > 0,05$) cuando la reacción se llevó a cabo sin adición de agua.

Cuando se empleó una ratio enzima/sustrato de 5/0,15 se pudo observar (Figura 9) que tanto sin como con presencia de agua hubo una reducción significativa ($p < 0,05$) del contenido en histamina del queso GP de 26,72% ± 1,84 y 26,66% ± 1,74, respectivamente.

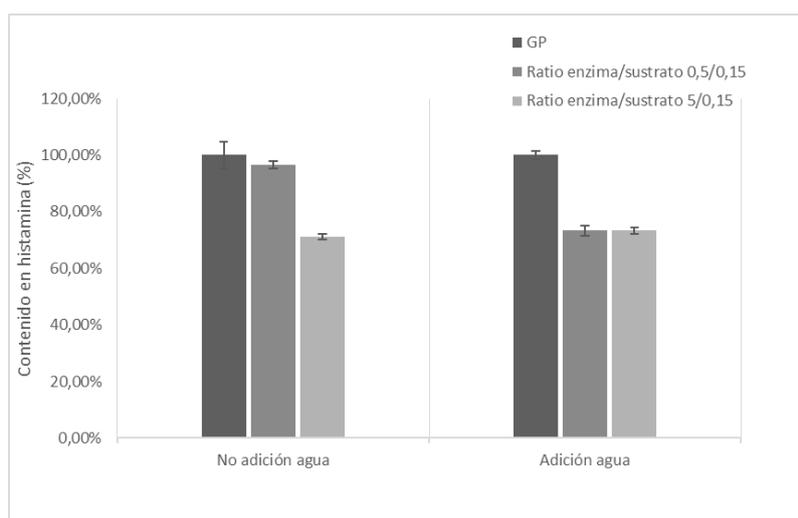


Figura 9. Contenido relativo en histamina en queso Grana Padano (GP) tras la adición de DAO vegetal.

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de reducción de histamina en GP obtenidos con ambas ratios enzima/sustrato, cuando la reacción tuvo lugar con adición de

agua. Estos resultados sugieren que el efecto del agua puede favorecer la movilidad de la enzima (Fernández-Velasco et al., 1995) lo que permite obtener un alto grado de degradación de histamina con ambas ratios enzima/sustrato cuando se emplea DAO vegetal procedente de guisantes. En cuanto al efecto del pH, a pesar de que en el queso Grana Padano es de 5,31, valor por debajo del pH óptimo de la enzima (7,2), hay que señalar que se consiguen reducciones en los niveles de histamina cercanas al 30%.

5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que la DAO vegetal procedente de guisantes germinados presenta una actividad enzimática específica significativamente más elevada que la DAO comercial de origen animal en sistemas modelo de histamina.

La ratio enzima/sustrato de 5/0,15 mg/mg es la más efectiva para degradar la histamina en el queso Grana Padano utilizando DAO comercial. Sin embargo, esta reducción solo se logra cuando se agrega agua al sistema, lo que indica que el agua puede tener un efecto favorecedor en la movilidad de la enzima y, por tanto, en la degradación de histamina.

En el caso de la DAO vegetal, se observa una reducción significativamente mayor del contenido de histamina en el queso Grana Padano si se compara con la DAO comercial. Con una ratio enzima/sustrato de 5/0,15 mg/mg, se obtienen reducciones significativas tanto con cómo sin la adición de agua, mientras que con una ratio 0,5/0,15 enzima/sustrato solo se observa una reducción del contenido de histamina con la adición de agua.

Estos resultados sugieren que la DAO vegetal procedente de guisantes germinados podría ser una opción viable para la degradación de histamina en quesos, especialmente cuando se emplea en combinación con agua. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para comprender mejor los mecanismos involucrados en la degradación de histamina y optimizar las condiciones de reacción enzimática.

6 BIBLIOGRAFIA

- Archives, N., & Administration, R. (1982). *Federal Register: 47 Fed. Reg. 40397 (Sept. 14, 1982)*.
- Botello-Morte, L., Moniente, M., Gil-Ramírez, Y., Virto, R., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2022). Identification by means of molecular tools of the microbiota responsible for the formation of histamine accumulated in commercial cheeses in Spain. *Food Control, 133*, 108595. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108595>
- 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)
- Calzada, J., Del Olmo, A., Picón, A., Gaya, P., & Nuñez, M. (2013). Reducing biogenic-amine-producing bacteria, decarboxylase activity, and biogenic amines in raw milk cheese by high-pressure treatments. *Applied and Environmental Microbiology, 79*(4), 1277-1283. <https://doi.org/10.1128/AEM.03368-12/FORMAT/EPUB>
- Cebrián Aznárez, P., Sanz Vicente, I., Cebrián. (2018). «*Development of colorimetric strip test to the determination of biogenic amines*». Universidad de Zaragoza.
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2020). Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance. *LWT, 125*, 109201. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109201>
- Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M., & Vidal-Carou, M. del C. (2020). Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules, 10*(8), 1181. <https://doi.org/10.3390/biom10081181>
- de A. Møller, C. O., Castro-Mejía, J. L., Krych, L., & Rattray, F. P. (2021). Histamine-forming ability of *Lentilactobacillus parabuchneri* in reduced salt Cheddar cheese. *Food Microbiology, 98*, 103789. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103789>
- DeBeer, J., Bell, J. W., Nolte, F., Arcieri, J., & Correa, G. (2021). Histamine Limits by Country: A Survey and Review. *Journal of Food Protection, 84*(9), 1610-1628. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-129>
- Díaz García, M. (2012). *Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias productoras de histamina en queso*. <http://hdl.handle.net/10651/4111>

- Doeglas, H. M., Huisman, J., & Nater, J. P. (1967). Histamine intoxication after cheese. *Lancet (London, England)*, 2(7530), 1361-1362. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(67\)90948-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(67)90948-8)
- Esener, A. A., Bol, G., Kossen, N. W. F., & Roels, J. A. (1981). Effect of water activity on microbial growth. En *Scientific and Engineering Principles* (pp. 339-344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025383-1.50062-X>
- Fernández-Velasco, D. A., de Gómez-Puyou, M. T., & Gómez-Puyou, A. (1995). Water and enzyme mobility. *AIP Conference Proceedings*, 342, 183-189. <https://doi.org/10.1063/1.48826>
- Fogel, W. A., Lewinski, A., & Jochem, J. (2007). Histamine in food: is there anything to worry about? *Biochemical Society Transactions*, 35(2), 349-352. <https://doi.org/10.1042/BST0350349>
- Huang, H., Li, Y., Liang, J., & Finkelman, F. D. (2018). Molecular regulation of histamine synthesis. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), 1392. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01392/BIBTEX>
- Izquierdo-Casas, J., Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Lorente-Gascón, M., Duelo, A., Soler-Singla, L., & Vidal-Carou, M. C. (2019). Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial. *Clinical Nutrition*, 38(1), 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.01.013>
- Joosten, H. M. L. J., & Olieman, C. (1986). Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermo-sensitized reaction detection. *Journal of Chromatography A*, 356, 311-319. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)91491-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)91491-2)
- Kettner, L., Seitzl, I., & Fischer, L. (2020). Evaluation of porcine diamine oxidase for the conversion of histamine in food-relevant amounts. *Journal of Food Science*, 85(3), 843-852. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15069>
- Kettner, L., Seitzl, I., & Fischer, L. (2022). Recent advances in the application of microbial diamine oxidases and other histamine-oxidizing enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 232. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03421-2>
- Kovacova-Hanuszkova, E., Buday, T., Gavliakova, S., & Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*, 43(5), 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.001>

- Miyawaki, O., Dozen, M., & Hirota, K. (2016). Cooperative hydration effect causes thermal unfolding of proteins and water activity plays a key role in protein stability in solutions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(2), 203-207. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.01.005>
- Moniente, M., García-Gonzalo, D., Llamas-Arriba, M. G., Virto, R., Ontañón, I., Pagán, R., & Botello-Morte, L. (2022). Potential of histamine-degrading microorganisms and diamine oxidase (DAO) for the reduction of histamine accumulation along the cheese ripening process. *Food Research International*, 160, 111735. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111735>
- Moniente, M., García-Gonzalo, D., Ontañón, I., Pagán, R., & Botello-Morte, L. (2021). Histamine accumulation in dairy products: Microbial causes, techniques for the detection of histamine-producing microbiota, and potential solutions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1481-1523. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12704>
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G. C., Bremer, P. J., & Meerdink, G. (2015). Emerging Approach: Reduce Histamine Poisoning with Diamine Oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(3), 225-230. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12224>
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G. C., Bremer, P. J., Meerdink, G., & Morton, R. H. (2012). Prediction of the amount and rate of histamine degradation by diamine oxidase (DAO). *Food Chemistry*, 135(4), 2650-2660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.022>
- Ohtsubo, Y., Kurooka, H., Tada, H., & Manabe, N. (2014). [Method for determination of histamine in food by LC-MS/MS]. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 55(2), 103-109. <https://doi.org/10.3358/SHOKUEISHI.55.103>
- Roig-Sagués, A. X., Molina, A. P., & Hernández-Herrero, M. M. (2002). Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*, 215(2), 96-100. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0521-2>
- Stratton, J. E., Hutkins, R. W., & Taylor, S. L. (1991). Copyright© International Association of Milk, Food and. En *Journal of Food Protection* (Vol. 54, Número 6).
- Vinci, G., Maddaloni, L., Prencipe, S. A., & Ruggieri, R. (2021). Natural Contaminants in Wines: Determination of Biogenic Amines by Chromatographic Techniques. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(19), 10159. <https://doi.org/10.3390/ijerph181910159>

Yang, R., Chen, H., Han, 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>

7 ANEXOS

ANEXO I. Objetivos de desarrollo sostenibles

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

La creación de una alternativa más eficiente y sostenible a los actuales tratamientos de la intolerancia a la histamina es un importante paso hacia el logro del ODS 3 de Salud y bienestar. El uso de enzima diamino oxidasa extraída de legumbres, permite reducir la histamina en quesos, lo cual puede mejorar significativamente la calidad de vida de las personas que sufren esta condición. Además, al estar basado en ingredientes de origen vegetal, este enfoque puede satisfacer las necesidades de aquellos consumidores que prefieren opciones de origen vegetal, promoviendo así una alimentación más saludable y equilibrada.

ODS 9 – Industria, Innovación e Infraestructura.

El desarrollo de esta nueva alternativa implica la promoción de la innovación y la investigación, lo cual está en línea con el ODS 9 de Industria, Innovación e Infraestructura. Al buscar soluciones más eficientes y sostenibles, se fomenta el avance en la industria y se estimula la mejora de la infraestructura necesaria para la producción y distribución de este tratamiento. Esto contribuye al progreso tecnológico y científico, generando beneficios tanto para el campo de la salud como para la sociedad en general.

ODS 12 – Producción y consumo responsables.

La elección de utilizar ingredientes vegetales en lugar de la alternativa actual basada en riñón de cerdo es una medida que apoya el ODS 12 de Producción y consumo responsables. Al optar por ingredientes de origen vegetal en la reducción histamina en quesos, se reduce la huella ecológica asociada a la producción y se promueve un consumo más responsable y sostenible. Esto contribuye a la conservación de los recursos naturales y al cuidado del medio ambiente, al tiempo que mejora el rendimiento de la alternativa.

ODS 13 – Acción por el clima.

El desarrollo de esta nueva alternativa también tiene un impacto en el ODS 13 de Acción por el clima. Utilizar DAO de origen vegetal apoya una mayor sostenibilidad y resiliencia climática, ya

que la industria cárnica es conocida por ser una de las principales fuentes de emisiones de gases de efecto invernadero.

ODS 15 – Vida de ecosistemas terrestres.

La elección de utilizar ingredientes vegetales en lugar de ingredientes de origen animal también tiene un impacto positivo en el ODS 15 de Vida de ecosistemas terrestres. La expansión de la agricultura destinada a la alimentación animal es una de las principales causas de la deforestación y la pérdida de hábitats naturales. Esto ayuda a proteger la biodiversidad y a mantener un equilibrio ambiental más saludable.

ANEXO II. Cromatogramas DAO vegetal y muestra GP

A continuación, se muestran los cromatogramas de las muestras de GP con DAO vegetal, tanto con cómo sin adición de agua, que han sido analizadas. El pico destacado a los 14,6 segundos corresponde a la detección de histamina.

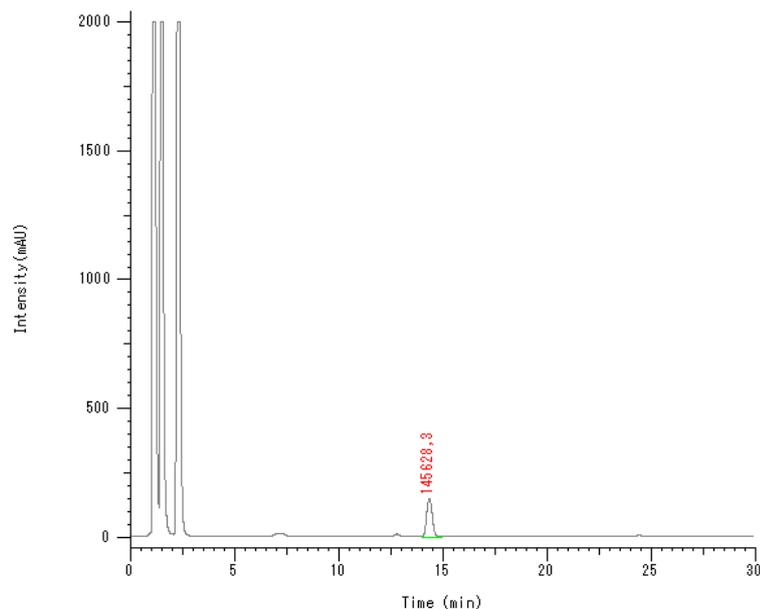


Figura 10. Patrón histamina 25ppm analizado para la DAO vegetal

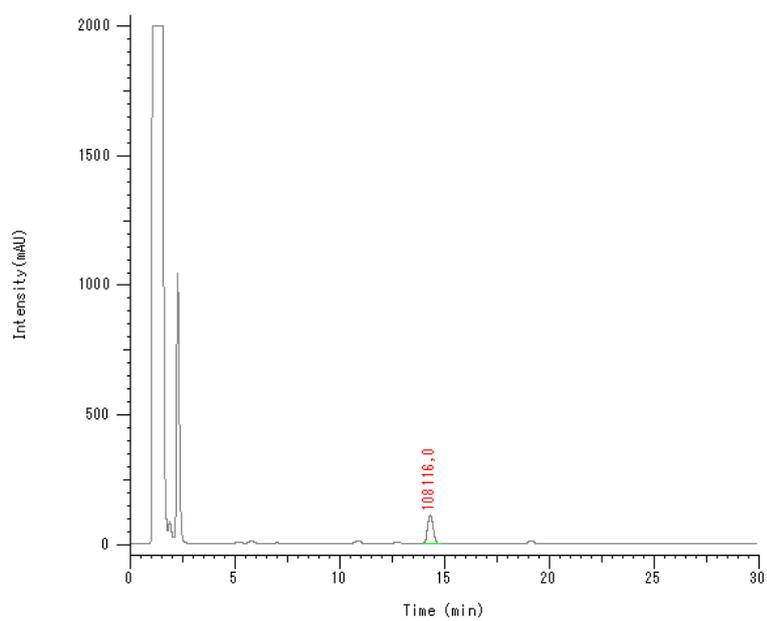


Figura 11. Cromatograma de la muestra control GP "con agua"

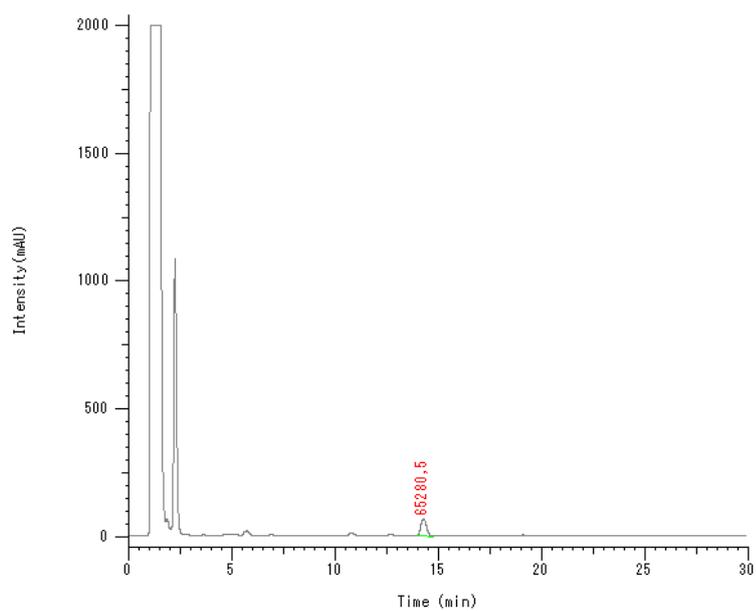


Figura 12. Cromatograma de la muestra GP "con agua" de DAO vegetal con ratio enzima/sustrato 5/0,15

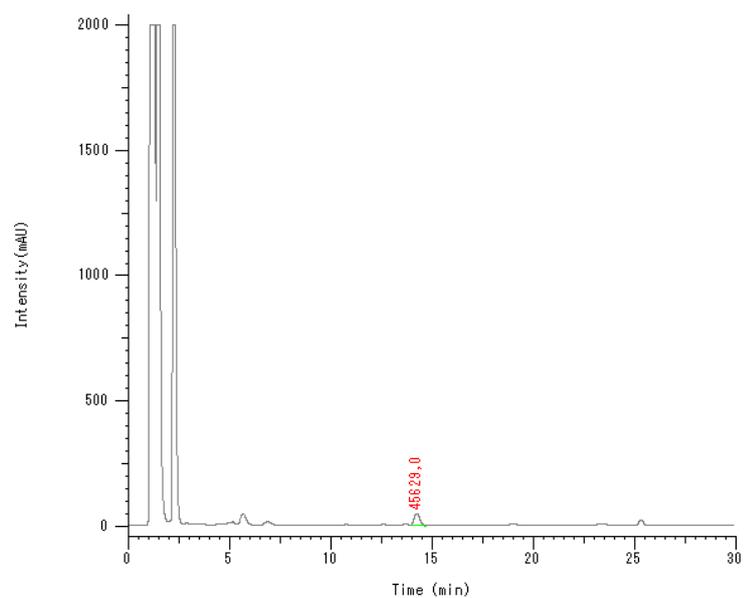


Figura 13. Cromatograma de la muestra control GP "sin agua"

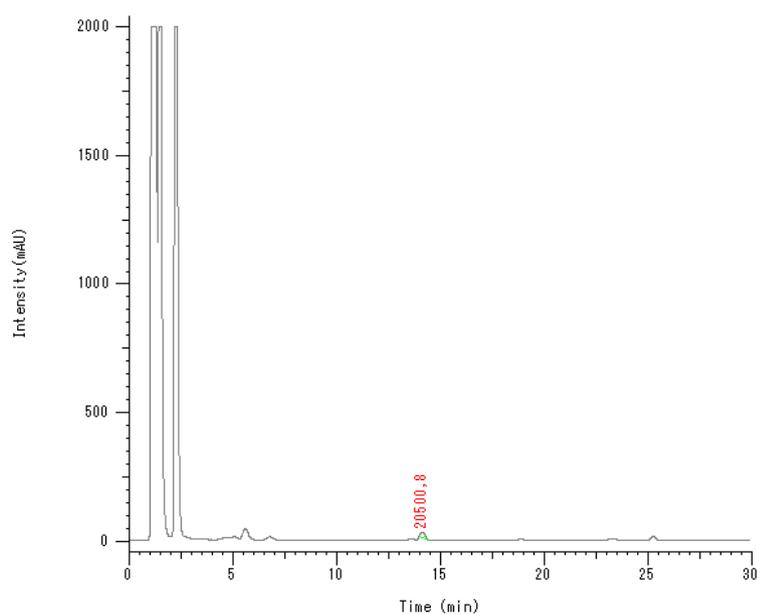


Figura 14. Cromatograma de la muestra GP "sin agua" de DAO vegetal con ratio enzima/sustrato 5/0,15

ANEXO III. Cromatogramas DAO animal y muestra GP

A continuación, se muestran los cromatogramas de las muestras de GP con DAO animal, tanto con cómo sin adición de agua, que han sido analizadas. El pico destacado a los 15,2 segundos corresponde a la detección de histamina.

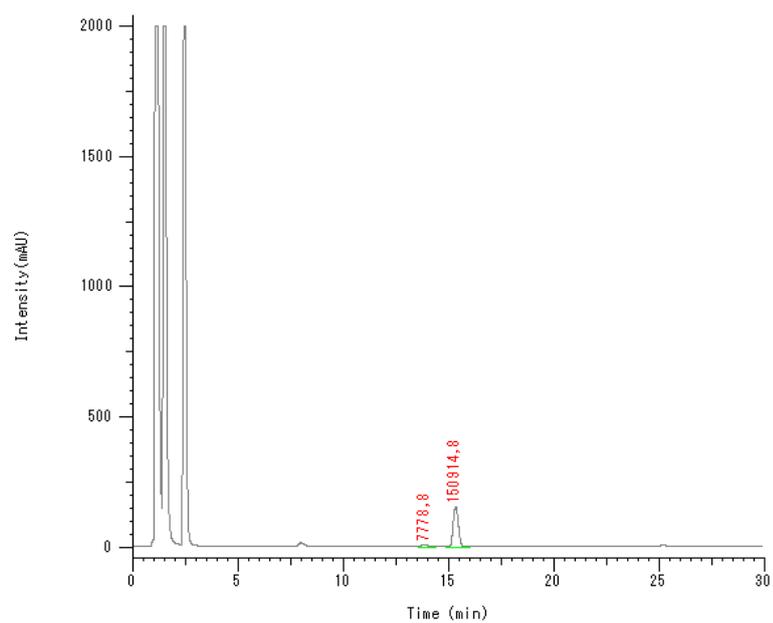


Figura 15. Patrón histamina 25ppm analizado para la DAO comercial

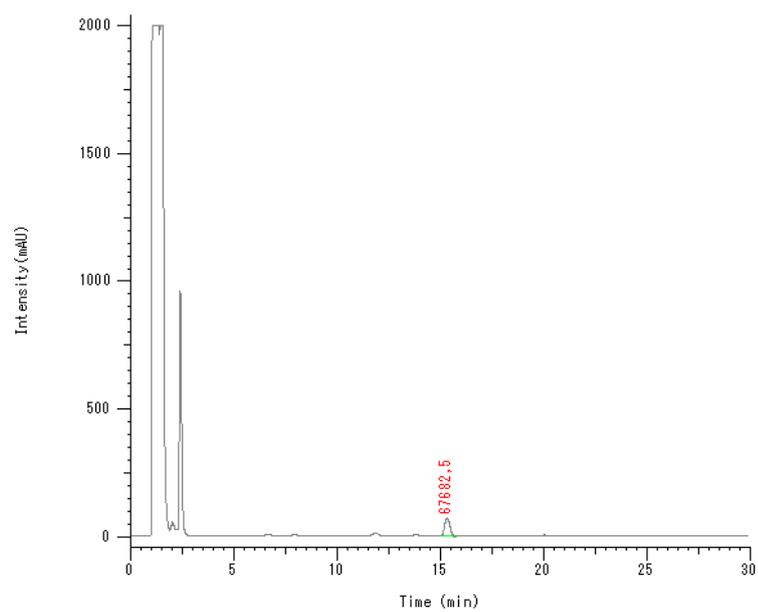


Figura 16. Cromatograma de la muestra control GP "sin agua"

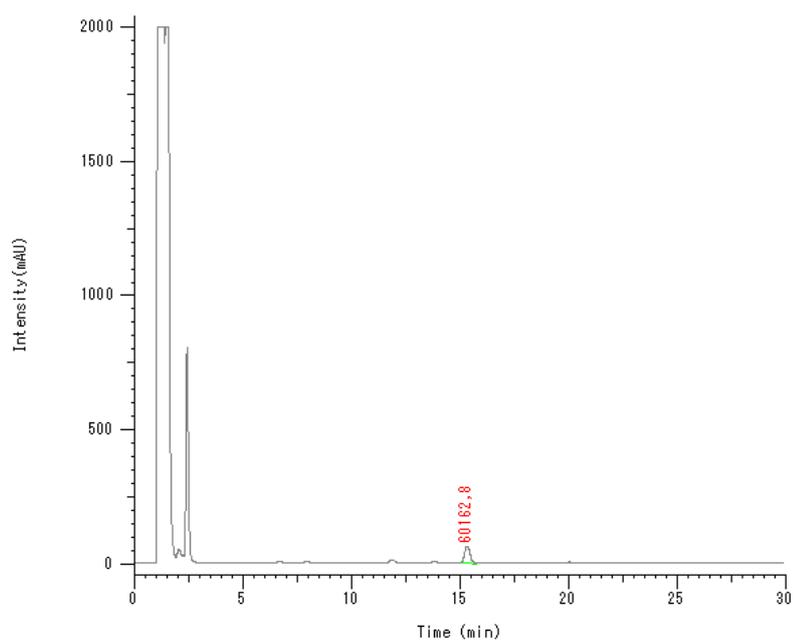


Figura 17. Cromatograma de la muestra GP "sin agua" de DAO animal con ratio enzima/sustrato 5/0,15

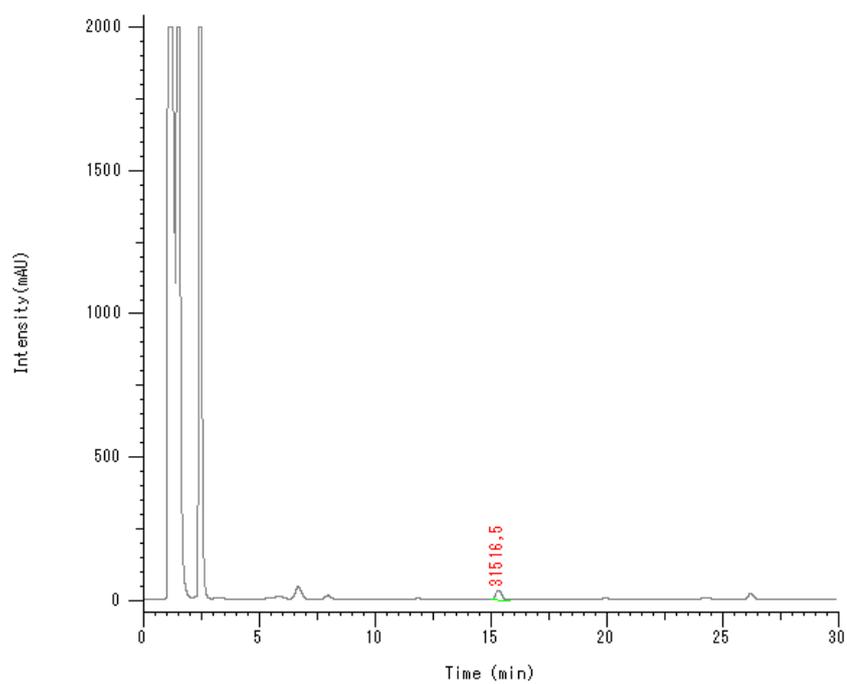


Figura 18. Cromatograma de la muestra control GP "con agua"

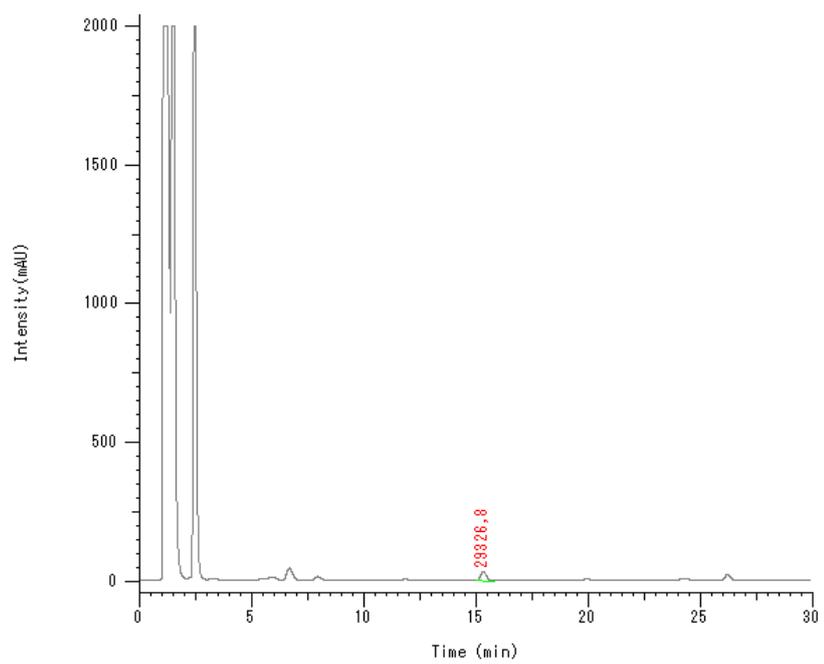


Figura 19. Cromatograma de la muestra GP “con agua” de DAO animal con ratio enzima/sustrato 5/0,15