

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**“ANÁLISIS EXPERIMENTAL DEL  
EFECTO DE FACTORES  
TECNOLÓGICOS EN LA  
ACUMULACIÓN DE BIOTOXINAS EN  
QUESOS”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**POR**

**CARMEN GARCÍA HERNÁNDEZ**

**JULIO, 2016**





Máster en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España



**TUTORES:**

Dr. D. Miguel Ángel Álvarez González (IPLA-CSIC)

Dr. Dña. Beatriz del Rio Lagar (IPLA-CSIC)

**CERTIFICAN:**

Que Dña. **Carmen García Hernández** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10ª promoción curso 2015-2016.

Oviedo, 10 de Julio de 2016

D. Miguel A. Álvarez González

Dña. Beatriz del Rio Lagar

VºBº

Mantel Rendueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria



## Agradecimientos

Gracias al Dr. Miguel A. Álvarez y a la Dra. Beatriz del Río, tutores de este trabajo que presento, por su revisión y correcciones. Agradezco a Beatriz por estar disponible cuando he necesitado respuestas, por ayudarme con las gráficas (ahora las domino perfectamente) y por indagar conjuntamente por qué se contaminaban algunas placas.

Gracias al Coordinador del Máster, Dr. Manuel Rendueles, por resolverme las dudas en cuanto a la estructura del trabajo.

Gracias a la Dra. María Fernández, Directora del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA) por haberme permitido realizar este Trabajo Fin de Máster en el centro.

Gracias a Víctor y M. Cruz por darme la bienvenida al IPLA y por estar dispuestos, en cualquier momento, a echarme una mano.

Gracias a Begoña por, siempre con una sonrisa, enseñarme a derivatizar las muestras y por ayudarme con los cromatogramas.

Gracias a Juan, María Jesús, Javi y Rocío por ser tan majos y hacerme compañía en el laboratorio.

Gracias a mis profesores del Máster por las enseñanzas recibidas.

Gracias a mis compañeros del Máster por el continuo apoyo que hemos tenido entre nosotros; por animarnos a superar las dificultades, por alegrarnos de los triunfos de los demás y por las risas que nos echamos.

Y gracias a mis padres, por todo y por más.



## Índice

1. Resumen .....	6
2. <i>Abstract</i> .....	7
3. Lista de figuras .....	8
4. Lista de tablas .....	10
5. Introducción .....	12
6. Consideraciones teóricas y/o experimentales .....	18
6.1. Bacterias del ácido láctico .....	18
6.2. Aminas biógenas .....	19
6.2.1. Definición y clasificación .....	19
6.2.2. Papel fisiológico de las aminas biógenas .....	23
6.2.3. Efectos tóxicos de las aminas biógenas .....	24
6.2.4. Presencia de aminas biógenas en alimentos .....	27
6.2.5. Factores implicados en la acumulación de aminas biógenas en alimentos .....	28
6.2.6. Estrategias para evitar la acumulación de aminas biógenas en quesos .....	30
7. Materiales y métodos .....	34
7.1. Microorganismos .....	34
7.2. Condiciones de cultivo .....	34
7.3. Microscopía confocal de contraste de fases .....	35
7.4. Análisis de histamina por UHPLC .....	35
7.4.1. Derivatización de las muestras .....	36
7.4.2. Separación cromatográfica de las muestras .....	36
7.5. Resistencia a la pasteurización de las cepas de <i>L. parabuchneri</i> .....	36
7.6. Resistencia térmica de las cepas de <i>L. parabuchneri</i> .....	37
7.7. Análisis estadístico .....	38
8. Resultados y discusión .....	40
8.1. Morfología de las colonias y de las células de las cepas de <i>L. parabuchneri</i> utilizadas en este estudio .....	40
8.2. Efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina en <i>L.</i> <i>parabuchneri</i> .....	43



8.3. Resistencia a la pasteurización de <i>L. parabuchneri</i> .....	50
8.4. Resistencia térmica de <i>L. parabuchneri</i> a temperaturas superiores a la de pasteurización .....	52
9. Conclusiones.....	56
10. Símbolos (y abreviaturas).....	57
11. Bibliografía.....	60



## 1. Resumen

Las aminas biógenas (AB) son compuestos orgánicos nitrogenados con actividad biológica que se producen por la descarboxilación enzimática de determinados aminoácidos en prácticamente todos los seres vivos. Sin embargo, debido a la acción microbiana, las AB se pueden acumular en altas concentraciones en ciertos alimentos como pescados y productos fermentados, y su consumo provoca problemas en la salud que pueden llegar a ser graves. Las principales AB que se encuentran en alimentos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y  $\beta$ -feniletilamina. En queso, la histamina puede alcanzar concentraciones muy por encima de los valores máximos admitidos por la Unión Europea (UE) (hasta 1.850 mg/kg). El consumo de alimentos con altas concentraciones de histamina produce intoxicaciones alimentarias conocidas como la enfermedad escombroides. El acúmulo de AB en queso se ha asociado a la presencia de ciertas bacterias Gram positivas, en concreto algunas pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL). Recientemente se ha determinado que la principal especie productora de histamina en quesos es *Lactobacillus parabuchneri* (Díaz *et al.*, 2016a). En este trabajo se determinó el efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina de 6 cepas de *L. parabuchneri*, 5 de ellas aisladas previamente de queso y la cepa tipo *L. parabuchneri* CECT 5740. Los resultados indican que en todas las cepas analizadas, la producción de histamina se vio favorecida en ausencia de oxígeno, aunque el crecimiento microbiano fue mucho menor que en condiciones de mayor presión de oxígeno (PO<sub>2</sub>). Teniendo en cuenta que este microorganismo forma parte de la microbiota de la leche (Brugmann *et al.*, 2016) y que ésta es una de las fuentes más importantes de microorganismos productores de AB en quesos, en este trabajo también se determinó la resistencia de las cepas de *L. parabuchneri* al tratamiento térmico de pasteurización y a tratamientos térmicos a temperaturas superiores a las de pasteurización. Los resultados mostraron que mientras algunas cepas fueron completamente sensibles al proceso de pasteurización, ya que no sobrevivieron el tratamiento térmico, otras mostraron cierta resistencia a este proceso. Sin embargo, todas las cepas de *L. parabuchneri* ensayadas fueron completamente inactivadas tras ser sometidas a tratamientos térmicos iguales o superiores a 68 °C.



## 2. Abstract

*Biogenic amines (BA) are biologically active nitrogenous compounds produced via the enzymatic decarboxylation of certain amino acids in virtually all living beings. However, BA can accumulate at high concentrations in certain foods such as fish and fermented products, due to microbial activity, and their consumption causes health problems that can become severe. The main BA present in foods are histamine, tyramine, putrescine, cadaverine and  $\beta$ -phenylethylamine. In cheese, histamine can reach concentrations above the maximum legal values established for the European Union (up to 1,850 mg/kg). The consumption of foods with high concentrations of histamine may produce a food intoxication known as Scombroid poisoning. The accumulation of BA in cheese has mostly been attributed to the presence of certain Gram positive bacteria, in particular the ones belonging to the group of lactic acid bacteria (LAB). Recently it has been determined that *L. parabuchneri* is the main histamine-producing species in cheeses (Díaz et al., 2016a). In this work, it was determined the effect of oxygen on the growth and on the production of histamine in six strains of *L. parabuchneri*, five of them previously isolated from cheese and also the type strain (*L. parabuchneri* CECT 5740). The results of this work indicated that in all analyzed strains, histamine production was favored in absence of oxygen, although the microbial growth was much lower than in conditions of higher oxygen pressure. Given that this microorganism is part of the microbiota of milk, which is one of the most important sources of BA-producing microorganisms in cheeses, in this work it was also determined the resistance of these *L. parabuchneri* strains to pasteurization and to heat treatments at temperatures above the pasteurization temperature. The results showed that while some strains were completely sensitive to pasteurization, since they did not survive the heat treatment, other strains showed some resistance to this process. However, all *L. parabuchneri* strains analyzed were completely inactivated after being subjected to heat treatments at 68 °C or higher temperatures.*



## 3. Lista de figuras

Figura	Título	Página
1	Reacción de descarboxilación de los aminoácidos y generación de las AB	20
2	Reacciones de descarboxilación implicadas en la biosíntesis de las principales AB	21
3	Estructura química y clasificación de las AB más frecuentemente encontradas en alimentos	23
4	Reacción de destoxificación de las AB mediada por amino oxidasas específicas	25
5	Crecimiento en placa de las cepas de <i>L. parabuchneri</i> utilizadas en este estudio	41
6	Fotografía de microscopio de contraste de fases de las cepas de <i>L. parabuchneri</i> utilizadas en este estudio	42
7	Efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina en <i>L. parabuchneri</i> IPLA 11122	44
8	Cromatograma obtenido mediante UHPLC de una muestra de un cultivo de <i>L. parabuchneri</i> IPLA 11122	45
9	Efecto del oxígeno en el crecimiento de diferentes cepas de <i>L. parabuchneri</i>	47
10	Efecto del oxígeno en la producción de histamina en diferentes cepas de <i>L. parabuchneri</i>	49





<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
11	Supervivencia a la pasteurización de diferentes cepas de <i>L. parabuchneri</i>	51
12	Resistencia térmica de <i>L. parabuchneri</i> a temperaturas superiores a la de pasteurización	53



#### 4. Lista de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Cepas de <i>L. parabuchneri</i> utilizadas en este estudio	34



# INTRODUCCIÓN



## 5. Introducción

La seguridad alimentaria es una de las preocupaciones actuales de los consumidores y de las autoridades sanitarias, quienes demandan alimentos carentes de microorganismos patógenos y sustancias tóxicas que puedan ser potencialmente perjudiciales para la salud, como es el caso de las AB.

Las AB son compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular, generados por la descarboxilación enzimática de determinados aminoácidos. Las AB son compuestos biológicamente activos que participan en funciones fisiológicas importantes tanto en organismos procariontes (protección frente al pH ácido, obtención de energía, etc.), como en los seres humanos (actúan como neurotransmisores, precursores de la síntesis de hormonas, ácidos nucleicos, proteínas, etc.). Sin embargo, el consumo de alimentos con una alta concentración de estas biotoxinas puede dar lugar a diversas reacciones adversas como problemas circulatorios (hipertensión, hipotensión), problemas respiratorios, migrañas, erupciones, etc. (Ladero *et al.*, 2010).

La principal fuente de AB exógenas son los pescados y los productos fermentados, en los que se acumulan ciertos microorganismos con la correspondiente actividad aminoácido descarboxilasa. Las AB que se encuentran más frecuentemente en alimentos son la histamina, la tiramina, la cadaverina, la putrescina y la  $\beta$ -feniletilamina, que se originan por la descarboxilación de la histidina, la tirosina, la lisina, la ornitina y la fenilalanina respectivamente (Ladero *et al.*, 2010).

Debido a su alta actividad biológica, la histamina es una de las AB que causa más intoxicaciones alimentarias (EFSA, 2011). Esta AB se acumula en pescados y en productos derivados de pescado debido fundamentalmente a la actividad descarboxilasa de bacterias Gram negativas contaminantes, cuya presencia se asocia con unas malas condiciones higiénicas durante el procesamiento y almacenamiento de dichos alimentos (Komprda *et al.*, 2004). En bebidas y alimentos fermentados, los principales microorganismos responsables de la producción de histamina son bacterias Gram positivas del grupo de las BAL que pueden formar parte de los cultivos iniciadores utilizados para la elaboración del producto o de la microbiota secundaria (Bover-Cid *et al.*, 2001), aunque también pueden ser microorganismos contaminantes. Los niveles



más altos de histamina se encuentran en derivados de pescado y en quesos (EFSA, 2011).

La histamina se genera a partir del aminoácido histidina por acción de la enzima histidina descarboxilasa (HDC). Las HDC se clasifican en dos tipos: las que requieren piridoxal-5'-fosfato (PLP) como cofactor, que pertenecen a las células eucariotas y a las bacterias Gram negativas; y las que usan el grupo piruvoil como grupo prostético, que pertenecen a las bacterias Gram positivas (Linares *et al.*, 2011). En humanos, la histamina modula una variedad de funciones biológicas a través de su interacción con los receptores específicos acoplados a proteínas G que poseen las células diana: H1, H2 y H3. Los receptores H1 se encuentran en el cerebro, donde participan en el control del ritmo circadiano, en la atención y en la cognición. También se localizan en los tejidos periféricos, donde median las respuestas de los músculos bronquial y vascular a la histamina en los procesos alérgicos. Los receptores H2, aunque están ampliamente distribuidos en el cuerpo, tienen como función principal regular la secreción del ácido gástrico y la contracción del músculo intestinal liso como respuesta a la presencia de histamina en el organismo (Ladero *et al.*, 2010). Los receptores H3 se expresan en alta densidad en los ganglios basales del telencéfalo y la unión de la histamina a estos modula la función de sus núcleos (Aquino *et al.*, 2012). La histamina también modula la actividad locomotora, la circulación cerebral, la temperatura corporal, la nocicepción, la ingestión de agua y de alimentos, la conducta sexual, las respuestas de defensa y de agresión, la memoria y el aprendizaje (Aquino *et al.*, 2012).

Debido a su importancia a nivel fisiológico, la concentración de histamina presente en células y en tejidos debe estar estrictamente controlada a nivel de biosíntesis y de catabolismo. La histamina de origen exógeno, que es la que proviene de la dieta y la que es sintetizada por la microbiota intestinal, se absorbe en el intestino donde es degradada antes de alcanzar el sistema circulatorio. Las AB se detoxifican en esta parte del aparato digestivo principalmente mediante reacciones de oxidación catalizadas por amino oxidasas específicas, que catalizan la desaminación de las AB generando un grupo aldehído (Linares *et al.*, 2011). Las amino oxidasas más importantes de este sistema de detoxificación son las monoamino oxidasas (MAO) y las diamino oxidasas (DAO). La histamina se metaboliza en el intestino por acción de las enzimas DAO (McCabe-Sellers *et al.*, 2006) y de la enzima citosólica histamina-N-metiltransferasa



(HNMT), que cataliza la metilación del anillo bencénico de la histamina. No obstante, según la cantidad de AB ingerida, el tipo de AB, el nivel de actividad del sistema de detoxificación y la susceptibilidad individual a las AB, éstas pueden causar diversos problemas clínicos. Además, la actividad detoxificadora puede estar reducida debido a factores genéticos o a la ingesta de compuestos como algunos antidepresivos, que inhiben la actividad enzimática de las MAO y de las DAO. Cuando la histamina ingerida con los alimentos no puede ser completamente detoxificada en el intestino, pasa al torrente sanguíneo y se distribuye hacia los tejidos causando efectos nocivos para la salud. La intoxicación causada por la histamina se denomina enfermedad escombroide, ya que en su origen se asoció con el consumo de pescados de la familia *Escombridae* (atún, bonito, caballa, etc.). Algunos de los síntomas que la caracterizan son cefalea, hipotensión, náuseas, vómitos, urticaria y edema (Vidal y Latorre, 2014). La ingesta de comidas con una cantidad de histamina igual o superior a 400 mg/kg se considera peligrosa para la salud (Taylor, 1986) y el consumo de 1.000 mg/kg de histamina se asocia con intoxicaciones severas (Rauscher-Gaberning *et al.*, 2009). Recientemente, Linares *et al.* (2016) demostraron el efecto citotóxico de esta amina a concentraciones encontradas en los alimentos (por encima de 440,6 mg/kg) en un modelo *in vitro* de epitelio intestinal humano.

La histamina es la única AB para la cual la EFSA (*European Food Safety Authority*) ha establecido límites legales en la UE, aunque sólo en pescados de la familia de los escómbridos (200 mg/kg) y en productos derivados de pescado (400 mg/kg) (Comisión Europea, 2005). No existen límites legales para la histamina -ni para ninguna otra AB- en otros alimentos, a pesar de que en productos fermentados como el queso la concentración de histamina puede exceder los 1.000 mg/kg (Fernández *et al.*, 2007).

Para determinar la presencia de histamina en alimentos se utilizan técnicas basadas en la cromatografía en capa fina [TLC, *Thin Layer Chromatography*, Linares *et al.*, 2011], cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución [HPLC, *High Performance Liquid Chromatography* (Önal, 2007)] y UHPLC [*Ultra-High Performance Liquid Chromatography* (Redruello *et al.*, 2013)]. También se han desarrollado métodos dependientes de cultivo para la detección y aislamiento de microorganismos productores de histamina; algunos de estos métodos están basados en medios de cultivo diferenciales que contienen un indicador de pH que cambia de color



debido a la alcalinización inducida por la biosíntesis de histamina (Díaz *et al.*, 2016c). Además, se han desarrollado métodos moleculares independientes de cultivo que permiten la detección de microorganismos productores de histamina tanto en la leche como en cada una de las etapas de elaboración del queso. Uno de estos métodos se basa en la amplificación del gen que codifica la histidina descarboxilasa (*hdcA*) mediante la técnica PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), que detecta y cuantifica microorganismos productores de histamina (Fernández *et al.*, 2006; Ladero *et al.*, 2008; Linares *et al.*, 2011). Asimismo, se ha desarrollado un método basado en la PCR seguida de electroforesis en gel en gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE) para la detección e identificación a nivel de especie de microorganismos Gram positivos productores de histamina en quesos (Díaz *et al.*, 2016c).

El queso es uno de los alimentos fermentados más comúnmente asociados con intoxicaciones por AB debido a que las reacciones microbianas y bioquímicas que ocurren durante el proceso de fabricación y de maduración, ofrecen condiciones óptimas para la actividad descarboxilasa de los microorganismos (Novella-Rodríguez *et al.*, 2002). Las AB que más frecuentemente se encuentran en quesos son la tiramina, la histamina, la putrescina y la cadaverina. La concentración de estas AB aumenta con el grado de maduración del queso y es mayor en quesos elaborados con leche cruda que con leche pasteurizada (Novella-Rodríguez *et al.*, 2004). En estos productos fermentados, la histamina se produce principalmente por la acción enzimática de las BAL con actividad histidina descarboxilasa de las especies *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Streptococcus thermophilus* y *L. parabuchneri*, entre otras. Esta última es la principal BAL responsable de la producción de histamina en quesos (Díaz *et al.*, 2016a) y tiene la capacidad de producir *biofilms*, los cuales se pueden establecer en la superficie de la maquinaria industrial de acero utilizada para el procesamiento de los quesos (rallado, loncheado,...) y actuarían como reservorio de estos microorganismos productores de histamina, los cuales contaminarían los quesos durante su procesamiento. La actividad histidina descarboxilasa de estas bacterias contaminantes de los quesos procesados generaría un mayor acúmulo de histamina en el producto final (Díaz *et al.*, 2016b; Díaz *et al.*, 2016a).

La presencia de microorganismos productores de AB es una condición esencial para que se puedan acumular estas biotoxinas en los alimentos, pero no es el único



requerimiento; la acumulación de AB también depende de diversos factores físico-químicos y tecnológicos como la disponibilidad del aminoácido sustrato, la temperatura de almacenamiento, la concentración de sal, la pasteurización de la leche, etc.

Uno de los factores físico-químicos que podría afectar a la concentración de histamina en quesos es el oxígeno. La  $PO_2$  cambia constantemente a lo largo del proceso de producción de dicho producto fermentado y en el propio producto final; la mayor  $PO_2$  se encuentra en las primeras etapas de elaboración del queso, que es cuando la leche se somete a agitación (antes de su coagulación) (Cretenet *et al.*, 2014). Asimismo, la  $PO_2$  varía de la superficie al interior del queso. Para preservar y alargar su vida útil, estos productos fermentados se pueden envasar en atmósferas modificadas, con baja  $PO_2$  y alta presión de dióxido de carbono ( $PCO_2$ ) y/o presión de nitrógeno ( $PN_2$ ). No obstante, se desconoce el efecto de estas atmósferas en la biosíntesis de AB.

## OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las altas concentraciones de histamina que se pueden acumular en quesos, y la importancia que tiene *L. parabuchneri* en la producción de esta AB en estos productos fermentados; en este trabajo se estudió el efecto de factores físico-químicos como el oxígeno en la biosíntesis de histamina por *L. parabuchneri* y se analizó la resistencia de este microorganismo a la pasteurización, con el fin de evitar o reducir la presencia de esta AB en quesos.

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

**Objetivo 1.-** Estudio del efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina en *L. parabuchneri*.

**Objetivo 2.-** Estudio de la resistencia de *L. parabuchneri* a la pasteurización y a temperaturas superiores a la de pasteurización.





# CONSIDERACIONES TEÓRICAS



## 6. Consideraciones teóricas y/o experimentales

### 6.1. Bacterias del ácido láctico

Las BAL son un grupo microbiano heterogéneo que incluye diversos géneros que se caracterizan por la producción de lactato como producto mayoritario de la fermentación de los carbohidratos. Poseen genomas con un bajo contenido en G+C (Guanina + Citosina), no esporulan, no son pigmentadas, no reducen nitratos y son ácido tolerantes. A pesar de su baja resistencia al O<sub>2</sub> y de ser catalasa negativas, las BAL se comportan como microorganismos anaerobios aerotolerantes (pueden vivir en presencia de oxígeno, pero no hacen uso del mismo) o microaerófilos (requieren bajas concentraciones de oxígeno para sobrevivir), ya que poseen enzimas como la superóxido dismutasa que les permite crecer en ambientes con baja PO<sub>2</sub> (Carr *et al.*, 2002).

Dentro del grupo de las BAL se incluyen especies de los géneros: *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Sporolactobacillus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus*, y *Weissella*, que pertenecen al filo *Firmicutes*. Debido principalmente a razones tecnológicas, en el grupo de las BAL también se incluyen los géneros *Bifidobacterium* y *Propionibacterium* que pertenecen al filo *Actinobacteria* y presentan genomas con un contenido en G+C superior al que presentan el resto de BAL (Makarova y Koonin, 2007).

La mayoría de las BAL tienen una limitada capacidad biosintética por lo que son muy exigentes nutricionalmente, requiriendo además de una fuente de carbono fermentable, factores de crecimiento complejos como vitaminas, purinas y pirimidinas (Dellaglio *et al.*, 1994). Además, son auxótrofas para un gran número de aminoácidos, es decir, no son capaces de sintetizar estas moléculas indispensables para su crecimiento. En ambientes como la leche, la cantidad de péptidos y aminoácidos libres es relativamente baja, siendo la caseína su principal fuente de nitrógeno. Debido a esto las BAL disponen de sofisticados sistemas proteolíticos que les permiten obtener todos



aquellos aminoácidos que no pueden sintetizar (Fernández *et al.*, 2008).

Dependiendo de los productos obtenidos durante la fermentación de las hexosas se clasifican en dos grupos: las BAL homofermentativas, que utilizan la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas produciendo exclusivamente lactato como producto final y las BAL heterofermentativas, que utilizan la ruta 6-fosfogluconatofosfocetolasa generando, además de lactato, otros productos como dióxido de carbono, etanol y acetato (Carr *et al.*, 2002).

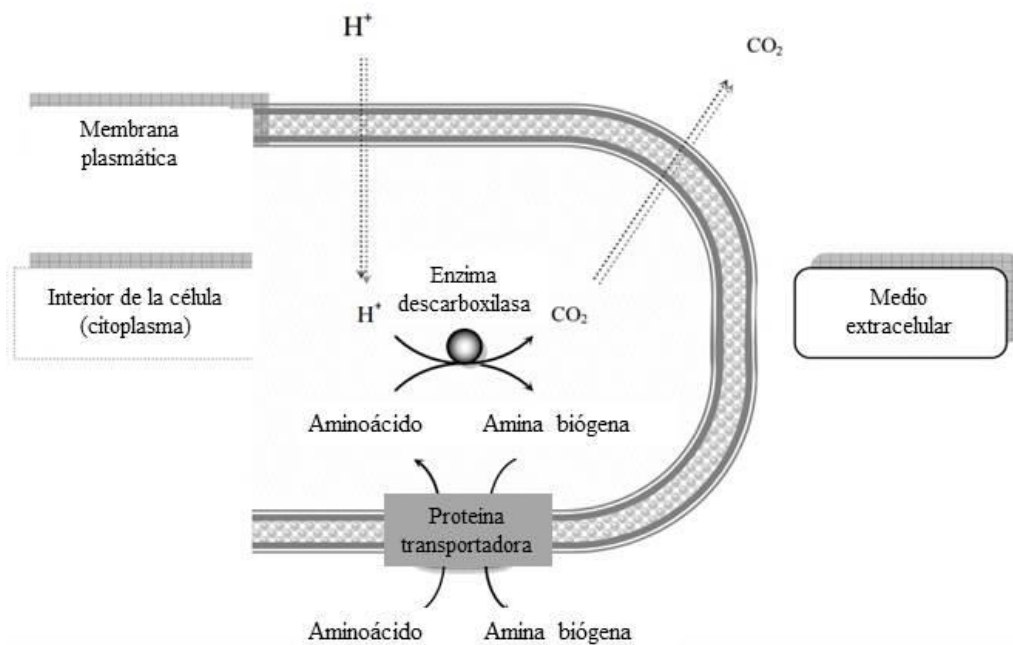
Las BAL tienen un papel muy importante en la industria alimentaria debido a la capacidad que tienen de acidificar la materia prima al producir ácido láctico a partir de la fermentación de los azúcares. Estos microorganismos se emplean principalmente como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos, ya que transforman la materia prima, dotan al producto con unas propiedades organolépticas específicas (aroma, sabor, textura...) y actúan como conservantes naturales (Leroy y de Vuyst, 2004). Las BAL tienen además un papel importante como cultivos adjuntos en muchos alimentos y bebidas fermentados (de Vos, 2011) y se pueden encontrar en productos lácteos, derivados cárnicos, derivados vegetales y pescados fermentados.

Las BAL se han considerado tradicionalmente como microorganismos seguros para su consumo; muchas especies de este grupo han sido reconocidas como QPS (*Qualified Presumption of Safety*) por la EFSA (EFSA, 2013). Cabe destacar que algunas cepas de estas bacterias tienen características probióticas, ya que ejercen efectos beneficiosos en la salud del consumidor. Sin embargo, algunas actividades metabólicas no deseadas de algunos de estos microorganismos pueden dar lugar a compuestos indeseables que afectan a la calidad de los alimentos, ocasionando aromas o sabores desagradables (p-cresol, fenol...), o a su seguridad como por ejemplo dando lugar a la formación de biotoxinas como las AB que pueden llegar a comprometer la salud del consumidor.

## 6.2. Aminas biógenas

### 6.2.1. Definición y clasificación

Las AB son compuestos orgánicos nitrogenados con actividad biológica que se producen por la descarboxilación enzimática de determinados aminoácidos (Ladero *et al.*, 2010). Las AB más frecuentes en alimentos son la tiramina, la histamina, la cadaverina, la putrescina y la  $\beta$ -feniletilamina. Algunos autores incluyen también a las poliaminas espermidina y espermina dentro del grupo de las AB, aunque la biosíntesis de estos compuestos requiere reacciones de descarboxilación y condensación (Moinard *et al.*, 2005). En la Figura 1 se muestra la descarboxilación de los aminoácidos que da lugar a sus correspondientes AB. La reacción requiere uno o más  $H^+$  y libera una o más moléculas de  $CO_2$  (grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido).

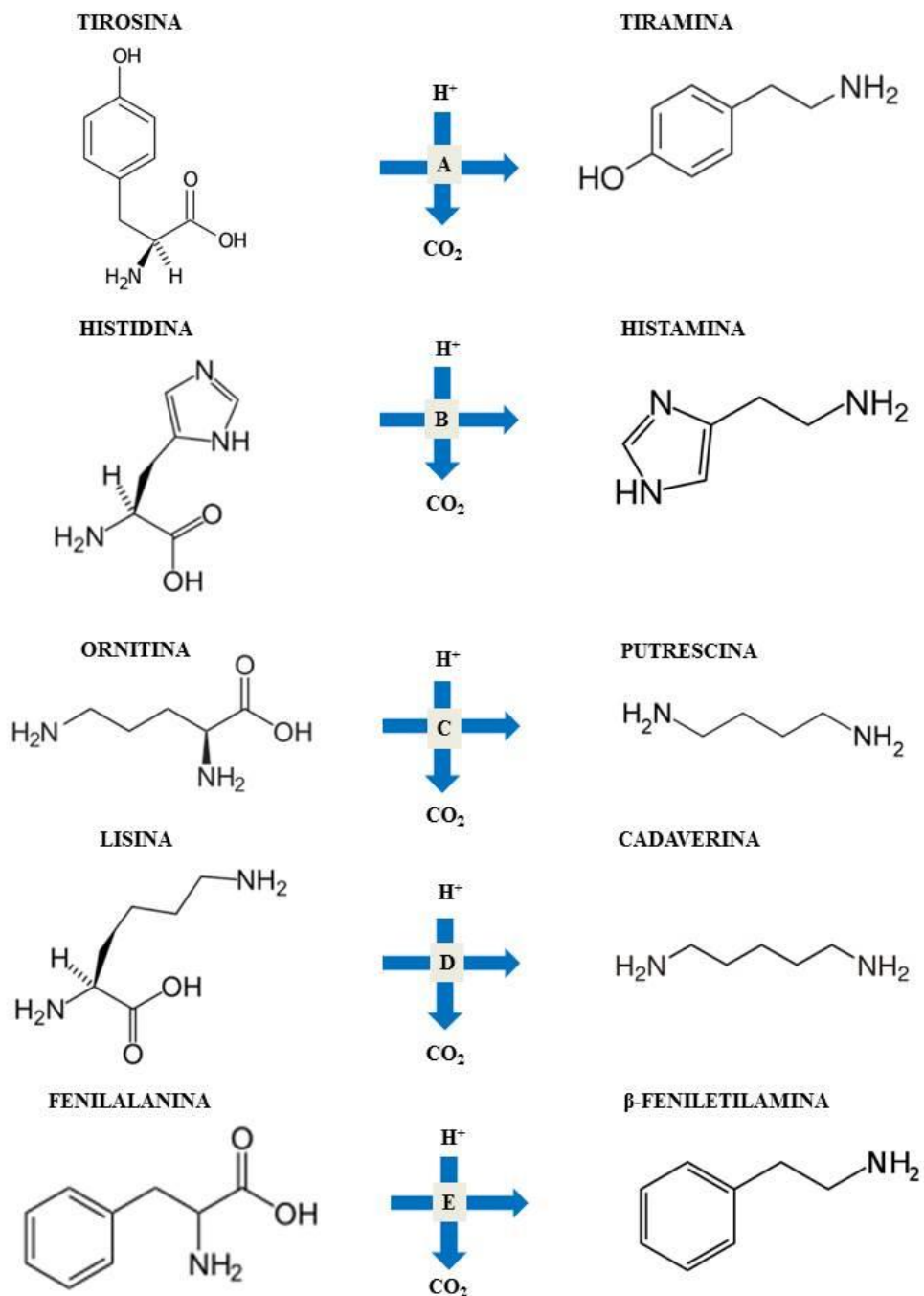


**Figura 1. Reacción de descarboxilación de los aminoácidos y generación de las AB.**

La proteína transportadora introduce en el interior de la célula el aminoácido (sustrato) para su descarboxilación y elimina la AB (producto) del citoplasma al medio extracelular. *Fuente:* modificado de EFSA, (2011).

En general, el nombre de una AB se asigna dependiendo del nombre del aminoácido del que procede: la tiramina se forma por descarboxilación de la tirosina, la histamina de la histidina, la triptamina del triptófano y la  $\beta$ -feniletilamina de la fenilalanina. Sin embargo, la cadaverina se sintetiza a partir de la descarboxilación de la lisina y la putrescina se forma por la descarboxilación de la ornitina o la desaminización

de la agmatina (Ladero *et al.*, 2010). En la Figura 2 se muestran las reacciones de descarboxilación implicadas en la biosíntesis de las principales AB encontradas en alimentos.

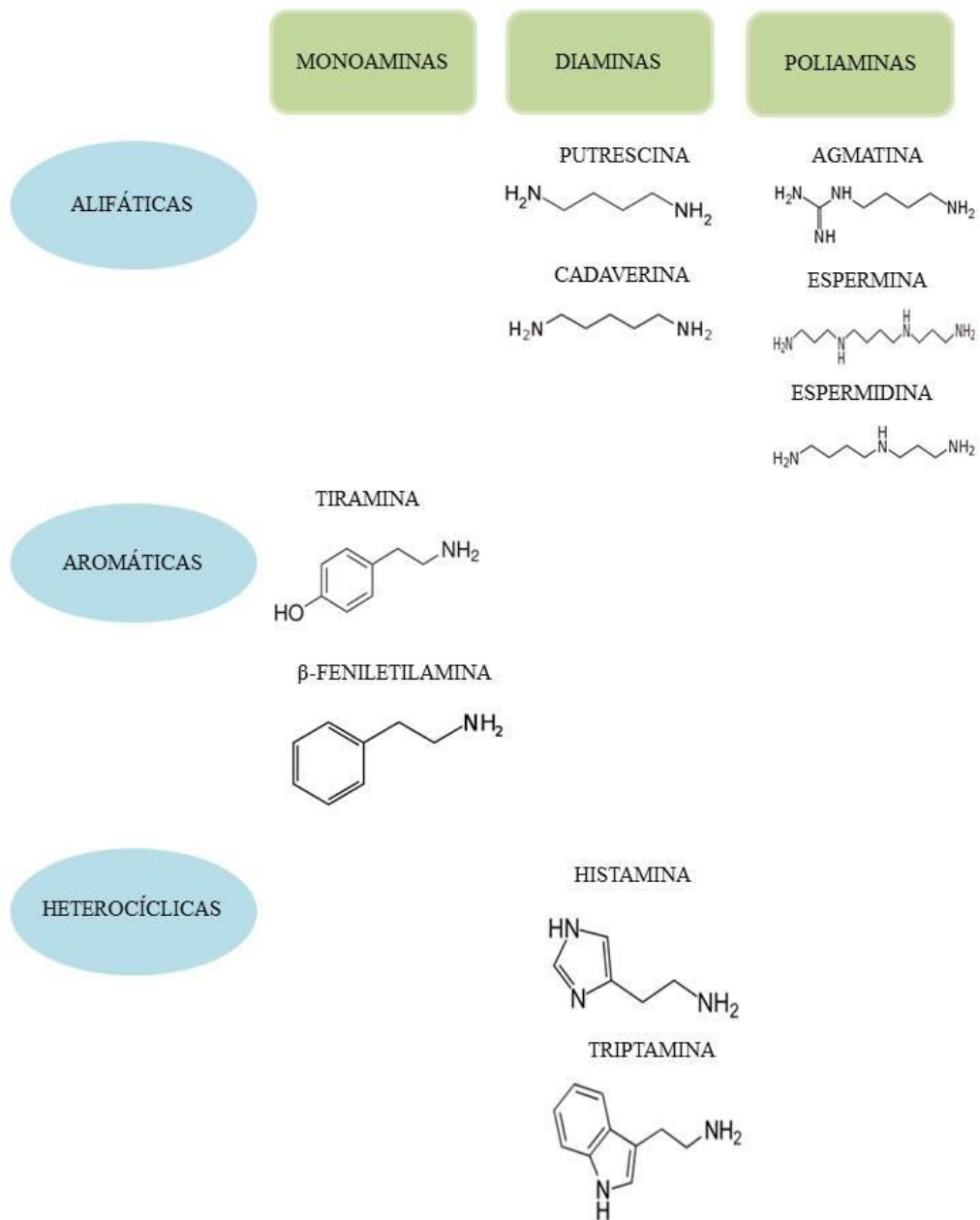


**Figura 2. Reacciones de descarboxilación implicadas en la biosíntesis de las principales AB. (A) Tirosina descarboxilasa, (B) Histidina descarboxilasa, (C) Ornitina descarboxilasa, (D) Lisina descarboxilasa, (E) Fenilalanina descarboxilasa.**



Las AB se pueden clasificar según su estructura química y según el número de grupos amino (Figura 3):

- Según su **estructura química** se pueden clasificar como AB alifáticas (putrescina, cadaverina, agmatina, espermina y espermidina), AB aromáticas – con núcleo bencénico– (tiramina y  $\beta$ -feniletilamina) o AB heterocíclicas (histamina y triptamina) (Ladero *et al.*, 2010).
- Según el **número de grupos amino** se pueden clasificar como monoaminas (tiramina y  $\beta$ -feniletilamina), diaminas (putrescina, cadaverina, histamina y triptamina) o poliaminas (agmatina, espermina y espermidina) (Linares *et al.*, 2011).



**Figura 3. Estructura química y clasificación de las AB más frecuentemente encontradas en alimentos.**

### 6.2.2. Papel fisiológico de las aminas biógenas

Desde un punto de vista biológico, las AB son moléculas con funciones fisiológicas esenciales ya que participan en procesos básicos como el crecimiento, la



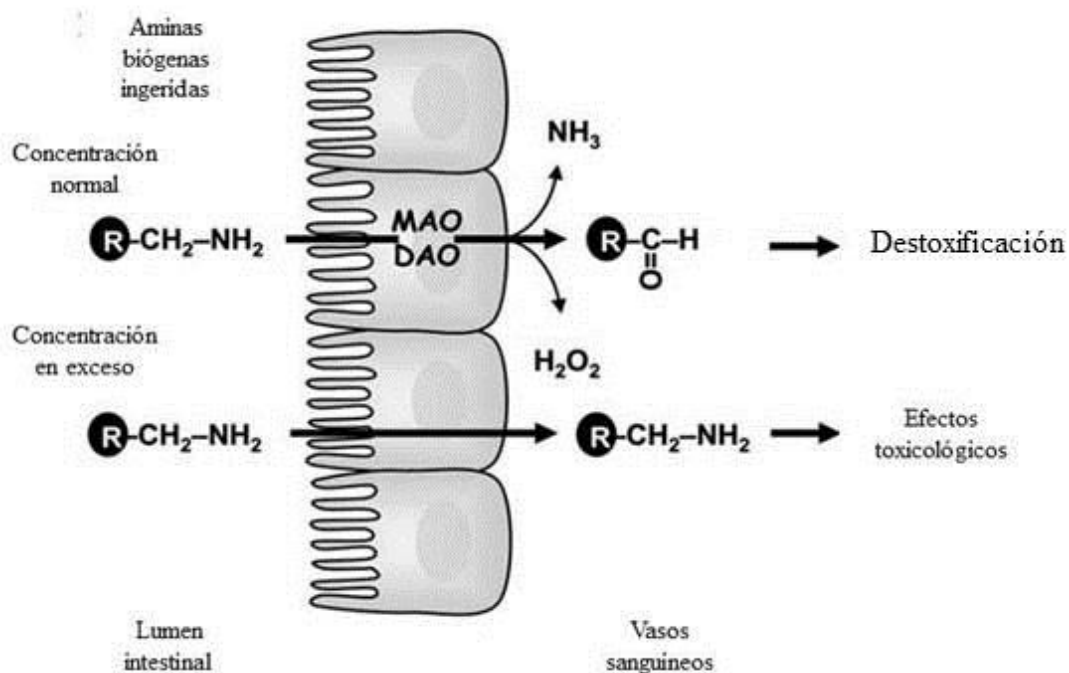
multiplicación y la diferenciación celular. En las células eucariotas la síntesis de AB es esencial, ya que estos compuestos funcionan como precursores de la síntesis de hormonas, ADN, ARN y proteínas (Linares *et al.*, 2011). Algunas AB como la tiramina y la histamina actúan como neurotransmisores. Además, la histamina está implicada en las respuestas locales del sistema inmune, actuando como mediador responsable del desencadenamiento de las reacciones de hipersensibilidad inmediata y alérgica (Ladero *et al.*, 2010). En procariotas la función fisiológica de las AB está relacionada con el papel que la reacción de descarboxilación podría desempeñar para la célula, el cual gira en torno a dos grandes funciones: mecanismo de resistencia frente al pH ácido y obtención de energía (Konings *et al.*, 1997). Así, el intercambio entre un aminoácido y su correspondiente AB está reconocido como un sistema general de homeostasis del pH, debido al consumo de un  $H^+$  en la reacción de descarboxilación, lo que contrarresta la acidificación intracelular en ambientes ácidos. De esta forma, la biosíntesis de tiramina en *Enterococcus faecalis* V583 tiene un papel importante en la resistencia al pH ácido, ya que participa en el mantenimiento del pH citosólico cuando la bacteria se encuentra en ambientes ácidos (Pérez *et al.*, 2014). Las bacterias también emplean la síntesis de AB como un modo de obtención de energía. La AB posee una carga neta positiva más que su correspondiente aminoácido precursor y durante el intercambio aminoácido/AB se genera un gradiente eléctrico o fuerza protón-motriz que la célula utiliza para el transporte de nutrientes o para generar ATP a través de la F1F0 ATPasa. De hecho, en *Lactobacillus buchneri* St2A, la biosíntesis de histamina genera una fuerza protón-motriz que deriva en la obtención de energía metabólica (Molenaar *et al.*, 1993). Un mecanismo similar se ha descrito para la biosíntesis de tiramina en *Lactobacillus brevis* IOEB9809 (Wolken *et al.* 2006). Esta función es especialmente importante en las BAL, ya que carecen de cadena respiratoria para la generación de ATP (Linares *et al.*, 2011). La producción de AB también puede mediar otras funciones fisiológicas en la bacteria como las respuestas osmótica y oxidativa (Linares *et al.*, 2011).

### 6.2.3. Efectos tóxicos de las aminos biógenas



El contenido total de AB en nuestro cuerpo está formado por AB de origen exógeno (proviene de los alimentos y de las AB producidas por la microbiota intestinal) y de origen endógeno (sintetizadas por las células de nuestro cuerpo) (Ladero *et al.*, 2010). Las AB exógenas se absorben rápidamente en el intestino donde son normalmente degradadas antes de alcanzar el sistema circulatorio (Uemura *et al.*, 2010).

En el tracto gastrointestinal del ser humano existe un sistema endógeno de detoxificación enzimática de AB localizado principalmente en el epitelio intestinal que metaboliza estas biotoxinas a compuestos con menor actividad (Figura 4). Las actividades enzimáticas más relevantes de este sistema son la MAO y la DAO, las cuales catalizan la desaminación oxidativa de las monoaminas y las diaminas, respectivamente, generando un grupo aldehído. Además se han descrito reacciones de metilación y acetilación en los procesos de detoxificación de la histamina (Linares *et al.*, 2011).



**Figura 4. Reacción de detoxificación de las AB mediada por amino oxidasas específicas.** El grupo amino de las AB se oxida por acción de las amino oxidasas, se genera un grupo aldehído y se liberan una molécula de amoníaco y otra de peróxido de hidrógeno. *Fuente:* modificado de Ladero *et al.*, (2010).



Las MAO, a su vez, se dividen en MAO-A y MAO-B. Las MAO-A desaminan la noradrenalina, la dopamina y la serotonina en el sistema nervioso central (SNC) y metabolizan las monoaminas procedentes de la dieta en el sistema gastrointestinal. Las MAO-B desaminan la tiramina y la  $\beta$ -feniletilamina en el hígado y en el músculo. Las DAO protegen al organismo de la histamina y la putrescina ingeridas mediante su desaminación en el intestino (Ladero *et al.*, 2010).

Este sistema de destoxificación ejerce una función protectora frente a concentraciones moderadas de AB presentes en los alimentos. Sin embargo, algunas personas son especialmente sensibles a la ingesta de AB debido a que su sistema de destoxificación está afectado, bien por causas genéticas o debido al consumo de ciertos fármacos antidepresivos basados en inhibidores de las MAO (IMAO) y las DAO (IDAO) (Flockhart, 2012; Ladero *et al.*, 2010). El tabaco es otro factor de riesgo que aumenta la probabilidad de sufrir síntomas asociados a las AB; los fumadores muestran una reducción de hasta el 30% en la actividad de sus MAO-A y MAO-B. El alcohol y el acetaldehído también aumentan los efectos tóxicos de las AB elevando la permeabilidad de la pared intestinal a estos compuestos (Ladero *et al.*, 2010). Además, algunas AB pueden potenciar los efectos tóxicos de otras AB, como es el caso de la cadaverina y la tiramina que potencian la toxicidad de la histamina (Maintz y Novak, 2007).

Cuando la cantidad de AB ingeridas en la dieta es demasiado alta para llevar a cabo una destoxificación eficiente o cuando el sistema de destoxificación está afectado, las AB pasan directamente al torrente sanguíneo y provocan distintos efectos tóxicos. Según la gravedad de los síntomas, los efectos de las AB se describen como reacción, intolerancia e intoxicación o envenenamiento (Ladero *et al.*, 2010). Las AB pueden causar hipertensión (tiramina, triptamina y  $\beta$ -feniletilamina), hipotensión (putrescina y cadaverina), migrañas (tiramina y  $\beta$ -feniletilamina), bradicardia y liberación de adrenalina y noradrenalina. Las intoxicaciones alimentarias más comunes asociadas a las AB son debidas al consumo de alimentos con alta concentración de histamina y/o tiramina.

La intoxicación por histamina está asociada al consumo de alimentos con una elevada concentración de esta AB, que supera la actividad de los sistemas de destoxificación del tracto gastrointestinal. Esta intoxicación también se conoce con el nombre de enfermedad escombroides, ya que en su origen se asoció con el consumo de



pescados de la familia *Escombridae* (atún, bonito, caballa, etc.). Algunos de los síntomas que caracterizan esta intoxicación son cefalea, hipotensión, náuseas, vómitos, diarrea, sarpullidos, urticaria, edema e inflamación localizados (Vidal y Latorre, 2014).

Por otra parte, en los años 60 del siglo XX, la ingestión de queso y otros productos alimenticios con altos niveles de tiramina se asoció con crisis hipertensivas en pacientes en tratamiento con IMAO; estas personas sufrieron un aumento de la presión sanguínea –lo que es actualmente conocido como “reacción del queso”–, migraña e incluso hemorragia cerebral o fallo cardíaco (Linares *et al.*, 2012; Shalaby, 1997).

Además algunas AB es posible que tengan efectos carcinogénicos, ya que pueden reaccionar con los nitritos presentes en los alimentos y formar nitrosaminas potencialmente carcinogénicas (Chalaby, 1997; Ladero *et al.*, 2010).

Aunque se acepta de forma general que no se debe permitir la acumulación de AB en los alimentos, la legislación existente en la UE que regula las concentraciones máximas de estas biotoxinas es insuficiente. Resulta complicado establecer un límite de concentración máximo de AB que se pueden ingerir sin que causen daños en la salud, ya que su efecto tóxico depende del tipo de AB en cuestión, de la presencia de compuestos moduladores y de la eficiencia del sistema de destoxicación de cada persona (Linares *et al.*, 2016). La única AB para la cual la UE establece límites legales es la histamina, aunque solo para pescados de la familia de los escómbridos (200 mg/kg) y para los productos derivados de pescado (400 mg/kg) (Comisión Europea, 2005). No obstante, se han establecido valores recomendados límite de histamina para alimentos en general (100 mg/kg) y para las bebidas alcohólicas (2 mg/l) (Halasz *et al.*, 1994).

#### 6.2.4. Presencia de aminas biógenas en alimentos

La presencia y la concentración de AB en los alimentos es muy variable, ya que dependen de la naturaleza del alimento y del tipo, crecimiento y actividad descarboxilasa de ciertos microorganismos presentes en ellos (Vidal y Latorre, 2014). Hay ciertos alimentos no fermentados, como frutas y verduras, en los que las AB se encuentran de forma intrínseca en bajas concentraciones. Sin embargo hay otros alimentos en los que se acumulan altas concentraciones de AB debido a la actividad



descarboxilasa microbiana, como son pescado y productos pesqueros, productos lácteos, carne y productos cárnicos, vegetales fermentados y bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza (EFSA, 2011).

Dentro de los productos fermentados cabe destacar los productos lácteos, en especial el queso, donde se pueden acumular elevados niveles de AB como la tiramina, histamina, putrescina y cadaverina (EFSA, 2011). El queso representa una matriz ideal para la producción de AB, ya que no es un medio estéril y la proteólisis de la caseína asegura la disponibilidad de sustrato libre (aminoácidos). La producción de AB difiere mucho entre los distintos tipos de quesos, lo que puede ser debido a los cultivos iniciadores empleados en la producción del mismo, a las bacterias que forman parte de la microbiota procedente de la leche, al tratamiento térmico de la leche (leche cruda o leche pasteurizada) y al proceso de maduración del queso (Linares *et al.*, 2012). Los quesos de larga maduración presentan concentraciones de AB muy superiores a los de corta maduración debido a que el contenido de aminoácidos libres aumenta con el tiempo (Linares *et al.*, 2011). Aunque puedan participar otros microorganismos, los principales responsables de la acumulación de AB en quesos son: *L. parabuchneri* (principal productor de histamina; Díaz *et al.*, 2016a), *E. faecalis* (principal productor de tiramina; Ladero *et al.*, 2012), y *E. faecalis* y algunas cepas de *Lactococcus lactis* (principales productores de putrescina; Ladero *et al.*, 2011a; Ladero *et al.*, 2012).

#### 6.2.5. Factores implicados en la acumulación de aminas biógenas en alimentos

El acúmulo de AB en alimentos es posible cuando convergen tres factores:

**1) Presencia de microorganismos productores de AB:** el acúmulo de AB en alimentos requiere de la presencia de microorganismos con la correspondiente actividad descarboxilasa. Para prevenir la aparición de AB en el producto final se debe utilizar una materia prima de buena calidad microbiológica y controlar la contaminación por microorganismos productores de AB a lo largo del proceso de elaboración. Además, se recomienda utilizar cultivos iniciadores seleccionados que no contengan microorganismos productores de AB (Spano *et al.*, 2010).



**2) Disponibilidad de sustrato (aminoácidos):** la síntesis de AB depende del aminoácido sustrato de la reacción. La disponibilidad de aminoácidos se encuentra ligada a las materias primas y a la tecnología del proceso fermentativo. Por ejemplo, la proteólisis de la caseína que tiene lugar durante la maduración del queso es un factor muy importante para la acumulación de AB en quesos, ya que en este proceso se generan aminoácidos libres que sirven de sustrato en las reacciones de descarboxilación (Linares *et al.*, 2011).

**3) Condiciones ambientales adecuadas:** se precisan condiciones adecuadas que favorezcan el crecimiento microbiano, la expresión de los genes relacionados con la síntesis de AB y las actividades enzimáticas descarboxilasa. Algunos de los factores que pueden influir en el acúmulo de AB en alimentos son:

- **pH:** este factor es uno de los más importantes en la producción de AB, ya que afecta a la actividad enzimática descarboxilasa de muchos microorganismos productores de AB. El pH ácido activa a muchas de las aminoácido descarboxilasas, como por ejemplo la HDC de algunas cepas de lactobacilos, en las que la acidez favorece su activación mediante la formación de puentes intramoleculares de hidrógeno (Schelp *et al.*, 2001). Además, el pH ácido puede inducir la transcripción de genes que codifican las descarboxilasas, como en el caso de *E. durans* (Linares *et al.*, 2009) y *E. faecalis* (Perez *et al.*, 2015), en los que la acidez induce la expresión del gen que codifica la tirosina descarboxilasa responsable de la biosíntesis de tiramina. Sin embargo, el pH ácido generado durante los procesos fermentativos inhibe el crecimiento de los microorganismos. Estos dos factores opuestos interfieren el uno con el otro y el resultado neto de la producción de AB depende de su balance (EFSA, 2011).
- **Sal:** la adición de NaCl a los alimentos se utiliza como método para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes. El NaCl es un ingrediente importante en la producción de queso, ya que proporciona aromas, confiere textura al producto y modifica el crecimiento de los microorganismos (Linares *et al.*, 2012). Además, tiene un papel importante en la reducción del



acúmulo de AB, ya que reduce el crecimiento de microorganismos productores de AB (Andic *et al.*, 2010; del Rio *et al.*, 2016), inhibe la actividad descarboxilasa responsable de la producción de AB (Chander *et al.*, 1989) e inhibe a nivel transcripcional ciertas rutas biosintéticas de AB como la de la producción de putrescina en *L. lactis* (del Rio *et al.*, 2016).

- **Oxígeno:** Buňková *et al.* (2012) observaron que *E. durans* CCDM 53, al igual que *L. lactis* (Buňková *et al.*, 2011), produce niveles más altos de tiramina bajo condiciones anaeróbicas que en condiciones aeróbicas. Se han obtenido resultados similares en algunas cepas de *Enterococcus faecium*, *L. brevis* (Marcobal *et al.*, 2006) y *L. curvatus*. Por todo esto, se puede decir que la tirosina descarboxilasa de muchas BAL tiene mayor actividad en ambientes anaerobios (sin oxígeno) (Buňková *et al.*; 2012). Además, hay un elevado número de alimentos procesados (lonchas de embutidos, quesos...) que se venden envasados al vacío o en atmósferas modificadas para impedir o retrasar el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, estos productos también es posible que presenten AB, ya que durante su procesamiento se pueden contaminar con microorganismos aminogénicos (Vidal y Latorre, 2014).
- **Procesos tecnológicos post-maduración:** los quesos procesados (cortado, loncheado o rallado) son susceptibles de presentar una mayor concentración de AB (Díaz *et al.*, 2016a). El queso rallado debido a su manipulación y al aumento de su relación superficie/volumen, es decir, a la extensión de su zona de contacto con los equipos de la industria alimentaria, tiene mayor presencia de bacterias productoras de AB (Linares *et al.*, 2012).

#### 6.2.6. Estrategias para evitar la acumulación de aminas biógenas en quesos

Durante el proceso de fabricación del queso hay factores que no se pueden modificar ya que son esenciales para el proceso de producción o porque podrían alterar





las propiedades organolépticas y sensoriales del producto final (la textura, el sabor o la calidad). Sin embargo, hay ciertos factores que se pueden modificar con el fin de reducir la presencia o el crecimiento de microorganismos productores de AB, y evitar la producción y acúmulo de estas biotoxinas en quesos (Ladero *et al.*, 2011b).

- **Temperatura:** el control de la temperatura es uno de los métodos más eficaces para prevenir la formación de AB en quesos (Linares *et al.*, 2012). De hecho, numerosos estudios han demostrado que existe una reducción en el acúmulo de AB en quesos fabricados y conservados a bajas temperaturas (Linares *et al.*, 2012). Esto se asocia a una reducción en el crecimiento de las bacterias y a una inhibición de la actividad proteolítica y descarboxilasa de estas. Los quesos producidos a menor temperatura de incubación (20 °C en lugar de 32 °C) presentan una reducción en la síntesis de AB (Linares *et al.*, 2011). Las temperaturas de congelación (-18 °C) detienen la actividad microbiana y evitan la acumulación de AB. Las altas temperaturas, en cambio, hacen que el contenido de AB en quesos aumente.
- **Cultivos iniciadores:** en la mayoría de las fermentaciones lácticas se utilizan cultivos iniciadores para asegurar la homogeneidad y calidad de los productos finales. Algunas BAL que se utilizan de forma general como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos fermentados (por ejemplo cepas pertenecientes a las especies *L. lactis*, *S. thermophilus*, etc.) poseen rutas biosintéticas de AB y por lo tanto, tienen el potencial de sintetizar estas biotoxinas que podrían acumularse en estos productos. Esto es particularmente importante en el proceso de elaboración del queso, en el que *L. lactis* –especie en la que se han encontrado cepas productoras de putrescina (del Rio *et al.*, 2015)– se utiliza como principal cultivo iniciador de la fermentación. Debido a esto, la EFSA recomienda el uso de cultivos iniciadores seleccionados que no sean productores de AB.
- **Otras variables tecnológicas:** la modificación del tipo o concentración del azúcar fermentable y la adición de agentes antimicrobianos (sulfitos) son otras estrategias que se proponen para prevenir la acumulación de AB, no solo durante la



elaboración, sino también durante el almacenamiento de los productos (EFSA, 2011). En este contexto, del Rio *et al.* (2015) determinaron que la lactosa, el principal azúcar de la leche, reprime la biosíntesis de putrescina en ciertas cepas de *L. lactis* portadoras de la ruta biosintética de esta AB, mientras que en otras cepas no tiene este efecto represor. Teniendo en cuenta que *L. lactis* es el principal cultivo iniciador en quesos, la represión por lactosa podría tener mucha importancia en la acumulación de putrescina en estos productos fermentados. Es por lo tanto recomendable seleccionar como cultivos iniciadores cepas de *L. lactis* no productoras de putrescina o, en su defecto, cepas cuya ruta biosintética de putrescina esté inhibida por la lactosa.





# MATERIALES Y MÉTODOS



## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Microorganismos

En este estudio se utilizaron 6 cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina: 5 cepas previamente aisladas de queso (*L. parabuchneri* IPLA 11122, *L. parabuchneri* IPLA 11129, *L. parabuchneri* IPLA 11125, *L. parabuchneri* IPLA 11150 y *L. parabuchneri* IPLA 11151), y la cepa tipo *L. parabuchneri* CECT 5740 aislada de saliva humana (Tabla 1).

<b>Cepas bacterianas</b>	<b>Origen</b>	<b>Productora de histamina</b>	<b>Fuente/Referencia</b>
<i>L. parabuchneri</i> IPLA 11122	Queso Emmental	+	Díaz <i>et al.</i> , 2016a
<i>L. parabuchneri</i> IPLA 11129	Queso Emmental	+	Díaz <i>et al.</i> , 2016a
<i>L. parabuchneri</i> IPLA 11125	Queso Emmental	+	Díaz <i>et al.</i> , 2016a
<i>L. parabuchneri</i> IPLA 11150	Queso Cabrales	+	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
<i>L. parabuchneri</i> IPLA 11151	Queso Cabrales	+	Díaz <i>et al.</i> , 2016b
<i>L. parabuchneri</i> CECT 5740	Saliva humana	+	CECT*

**Tabla 1.** Cepas de *L. parabuchneri* utilizadas en este estudio. \*CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

### 7.2. Condiciones de cultivo



Las bacterias se crecieron a 37 °C en medio de cultivo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe; Oxoid, Hampshire, Reino Unido). Para obtener colonias aisladas de cada cepa, las bacterias se sembraron en placas con medio MRS sólido (MRS suplementado con 2% de agar) a partir de cultivos puros de conservados a -80 °C utilizando la técnica de agotamiento por estría. Para determinar el efecto de la PO<sub>2</sub> en el crecimiento y en la producción de histamina, las cepas de *L. parabuchneri* se crecieron en 10 ml de medio MRS (Oxoid) suplementado con histidina 10 mM (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en anaerobiosis (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 80% N<sub>2</sub>) en una cámara Mac 500 (Don Whitley Scientific, West Yorkshire, Reino Unido), en aerobiosis estático (sin agitación) en una estufa (Memmert, Schwabach, Alemania) y en aerobiosis con agitación en un agitador orbital Excella E24 (Eppendorf, Hamburg, Alemania) a una velocidad de 250 rpm. A los tiempos que se indican en cada ensayo, se sacaron muestras de 1 ml de cada cultivo y se determinó el crecimiento bacteriano midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm (DO<sub>600</sub>) en un espectrofotómetro (Eppendorf, NY, Estados Unidos). Para determinar la producción de histamina en cada cultivo, se centrifugaron muestras de 1 ml a 14450 rpm durante 5 min en una microcentrífuga de sobremesa (Eppendorf) y se recogió el sobrenadante. La histamina acumulada en los sobrenadantes se determinó mediante la técnica de cromatografía líquida UHPLC, tal y como se describe en el apartado 7.4.

Para determinar la resistencia de las cepas de *L. parabuchneri* a la pasteurización y a temperaturas superiores a las de pasteurización, las bacterias se inocularon en 5 ml de leche desnatada al 10% (Oxoid), a una densidad óptica final de 2 (DO<sub>600</sub>=2).

### 7.3. Microscopía confocal de contraste de fases

Las cepas de *L. parabuchneri* se cultivaron en medio MRS durante 24 h. La morfología de las bacterias se observó mediante un microscopio confocal de contraste de fases Nikon Eclipse 90i (Nikon Corporation, Tokyo, Japón) con un objetivo de 100 aumentos (aumento de los oculares 10X).

### 7.4. Análisis de histamina por UHPLC



El análisis cuantitativo de la producción de histamina a partir de los sobrenadantes de las muestras se realizó mediante la técnica UHPLC.

#### 7.4.1. Derivatización de las muestras

Los sobrenadantes de las muestras se derivatizaron con el reactivo DEEMM (dietiletoximetilen malonato) (Sigma-Aldrich), siguiendo el método descrito por Redruello *et al.* (2013). En este protocolo se mezclaron 100 µl del sobrenadante libre de células con 175 µl de ácido bórico 1 M (ajustado a pH 9 con NaOH), 75 µl de metanol (Sigma-Aldrich), 3 µl de DEEMM (Sigma-Aldrich) y 2 µl de ácido 2-aminoadípico (2 mg/ml) (estándar interno) (Sigma-Aldrich). Esta mezcla se agitó y se incubó en un baño de ultrasonidos (Ultrasons-H, JP Selecta, Barcelona, España) a 30 °C durante 45 min para conseguir la derivatización de los compuestos aminados presentes en las muestras. Después estas se incubaron a 70 °C en un baño de agua WB-22 (Mettler) durante 2 h para degradar el exceso de DEEMM libre, y se centrifugaron a 14450 rpm durante 5 min en una microcentrífuga de sobremesa (Eppendorf). Finalmente, las muestras se filtraron con ayuda de una jeringuilla sin aguja a través de una membrana de nailon de 0,2 µm de poro y se depositaron en un vial cónico (Waters, Massachusetts, Estados Unidos). Cuando fue necesario, las muestras se diluyeron con agua Milli Q en la proporción 1:10.

#### 7.4.2. Separación cromatográfica de las muestras

La separación cromatográfica de las muestras derivatizadas se realizó con el cromatógrafo H-Class Acquity UPLC™ SYSTEM (Waters) y una columna Waters Acquity UPLC™ BEH C18 1,7 µm (2,1 mm x 200 mm). La detección se llevó a cabo determinando la absorbancia a 280 nm y los datos se analizaron con el *software* Empower versión 2 (Waters) (Redruello *et al.*, 2013).

### 7.5. Resistencia a la pasteurización de las cepas de *L. parabuchneri*



Para comprobar la resistencia de las cepas de *L. parabuchneri* a la pasteurización, se siguió el protocolo descrito por Ladero *et al.* (2011b). La leche desnatada estéril (5 ml) se dispensó en tubos de 10 ml de plástico estériles y se precalentó a 37 °C. Las cepas de *L. parabuchneri* se inocularon de forma individual en los tubos con leche de forma que el número de bacterias final en esta fue de  $10^8$  ufc/ml (unidades formadoras de colonias/ml). Las muestras de leche inoculadas con las bacterias se sometieron al proceso de pasteurización siguiendo la definición de la *International Dairy Foods Association* (IDFA) y el protocolo descrito por Ladero *et al.*, (2011b). Para ello, las muestras se incubaron a 63 °C en un baño de agua WB-22 durante 30 min. Una vez finalizado el tratamiento, las muestras pasteurizadas se metieron en un baño de hielo. De cada muestra se extrajeron 100 µl y se realizaron diluciones seriadas en la proporción 1:10 en medio MRS. Para determinar la viabilidad de las bacterias tras el proceso de pasteurización se dispensaron gotas de 10 µl de cada una de las diluciones en placas con medio MRS sólido. Las células se incubaron durante 48 h a 37 °C y se determinó el número de bacterias viables por ml (ufc/ml). El tratamiento de pasteurización se realizó para cada cepa utilizando 3 cultivos independientes (provenientes de 3 colonias bacterianas diferentes). Tras la pasteurización, se calculó la viabilidad media de los 3 cultivos y la desviación estándar.

#### 7.6. Resistencia térmica de las cepas de *L. parabuchneri*

Para determinar la resistencia de las cepas seleccionadas de *L. parabuchneri* a temperaturas superiores a la de pasteurización, se siguió el protocolo descrito por Ladero *et al.* (2011b). Para ello, se inocularon tubos con 5 ml de leche desnatada con cada una de las cepas de *L. parabuchneri* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.5. A continuación, las muestras de leche inoculadas con las bacterias se incubaron a la temperatura de pasteurización (63 °C), y a 68, 73 y 78 °C en un baño de agua WB-22 durante 30 min. Una vez finalizado el tratamiento, las muestras se metieron en un baño de hielo. Seguidamente se determinó la viabilidad de las células en cada muestra como se ha descrito en el apartado 7.5. El tratamiento se realizó para cada



cepa utilizando 3 cultivos independientes. Tras el proceso, se calculó la viabilidad media de los 3 cultivos y la desviación estándar.

### 7.7. Análisis estadístico

Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre grupos de muestras, se aplicó el Test *t-Student* ([http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test\\_bulk\\_form.htm](http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test_bulk_form.htm)). El nivel de significación se estableció en  $p < 0,05$ .



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 8. Resultados y discusión

Como se indicó previamente, los principales microorganismos productores de histamina en quesos pertenecen a la especie *L. parabuchneri*. Por lo tanto, es importante determinar el efecto de distintos factores físico-químicos y tecnológicos en la biosíntesis de histamina en estos microorganismos. Debido a esto, uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar el efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina en diferentes cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina: 3 cepas previamente aisladas de queso Emmental (Díaz *et al.*, 2016a), 2 cepas aisladas de queso Cabrales (Díaz *et al.*, 2016b) y la cepa tipo *L. parabuchneri* CECT 5740 aislada de saliva humana (Tabla 1).

### 8.1. Morfología de las colonias y de las células de las cepas de *L. parabuchneri* utilizadas en este estudio

Antes de analizar el efecto de la  $PO_2$  en el crecimiento y en la producción de histamina en las seis cepas de *L. parabuchneri* seleccionadas se determinó la morfología de las colonias y de las células de cada una de estas. Todas las cepas presentaron colonias circulares de color blanco brillante (Figura 5). En el microscopio confocal de contraste de fases las bacterias presentaron morfología bacilar en forma de bastón; en la preparación se observaron bacilos aislados y largas cadenas de células sin dividir (Figura 6). Además, las células de las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11129 y *L. parabuchneri* IPLA 11151 presentaron cierta tendencia a la agregación lo que podría estar relacionado con su capacidad de formar *biofilms* (Díaz *et al.*, 2016a).



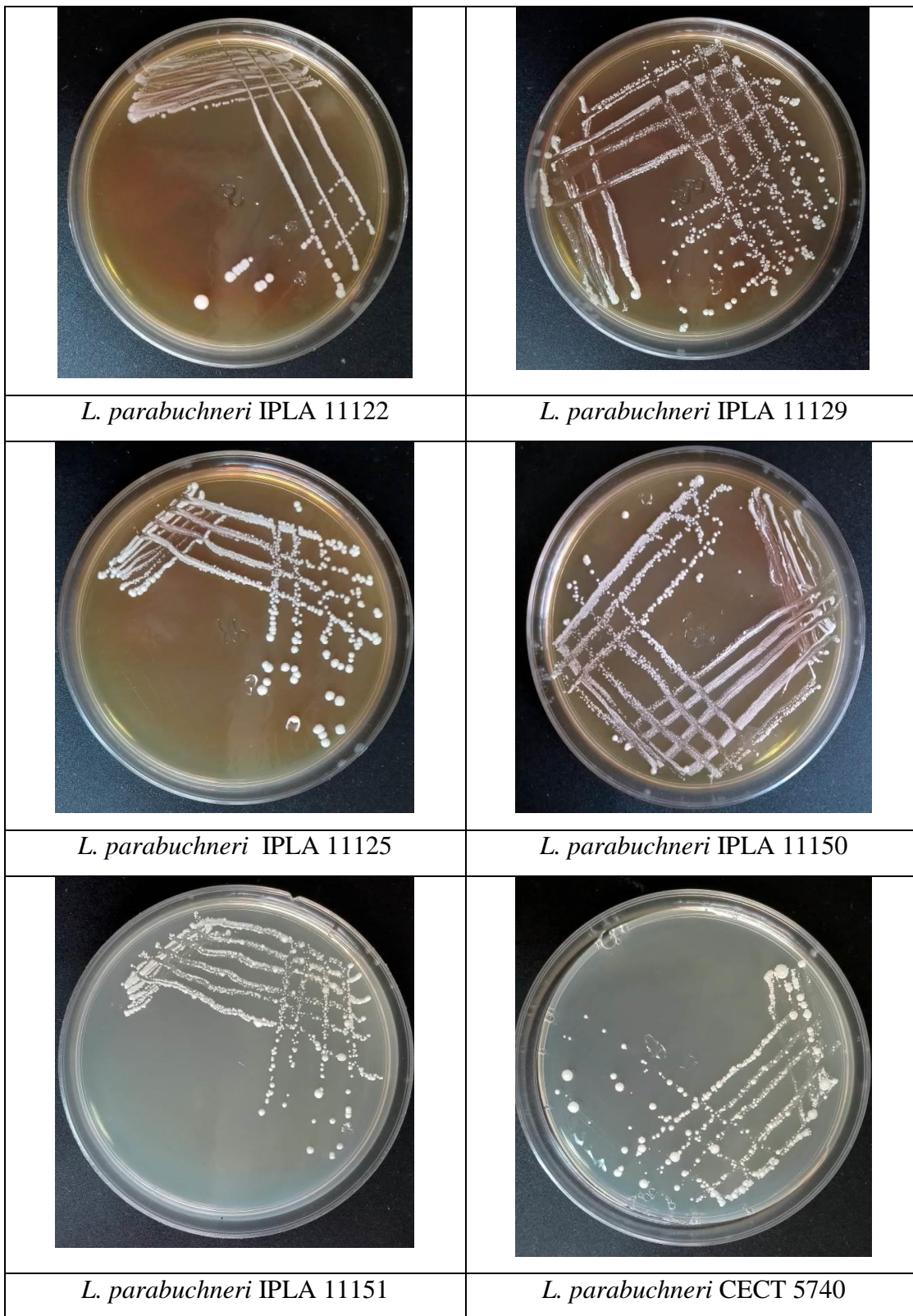
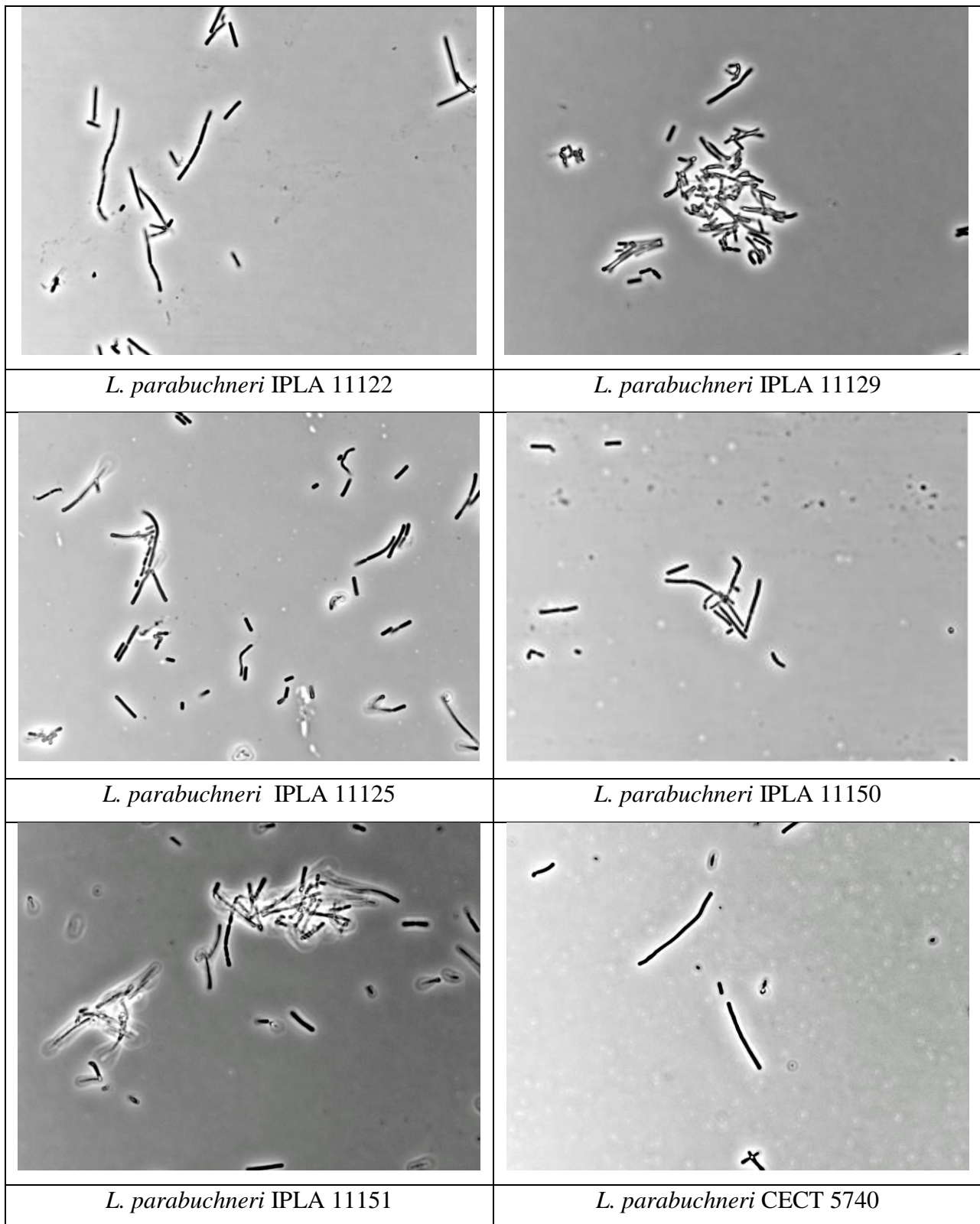


Figura 5. Crecimiento en placa de las cepas de *L. parabuchneri* utilizadas en este estudio.

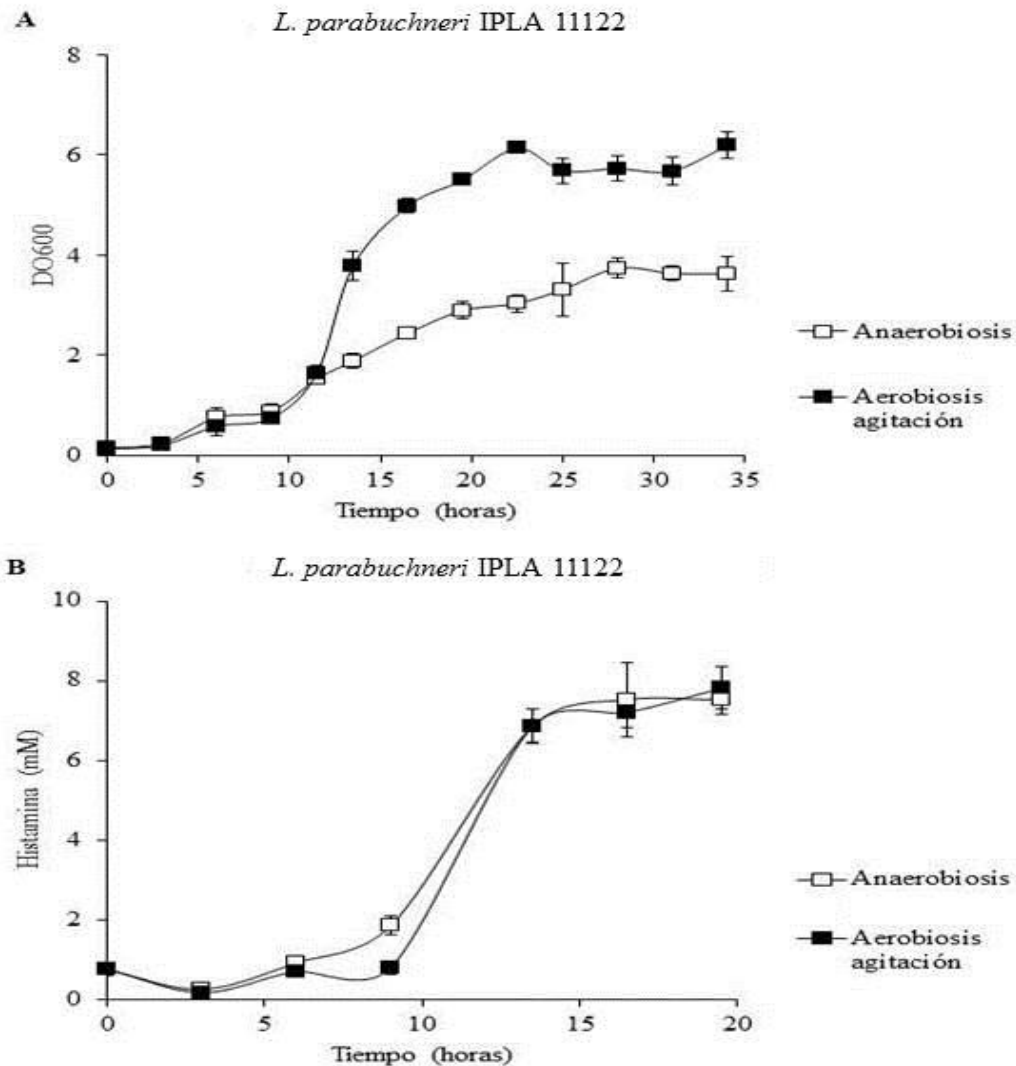


**Figura 6. Fotografía de microscopio de contraste de fases de las cepas de *L. parabuchneri* utilizadas en este estudio. Aumento X100.**



## 8.2. Efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina en *L. parabuchneri*

En primer lugar se analizó el efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina de la cepa *L. parabuchneri* IPLA 11122. Para ello, las células se cultivaron en medio MRS suplementado con 10 mM de histidina durante 35 h a 37 °C en dos condiciones diferentes de PO<sub>2</sub>: anaerobiosis y aerobiosis con agitación. Cada 3 h se recogieron muestras, se determinó el crecimiento (DO<sub>600</sub>) y se cuantificó la histamina acumulada en el medio mediante UHPLC. Los resultados se muestran en la Figura 7.



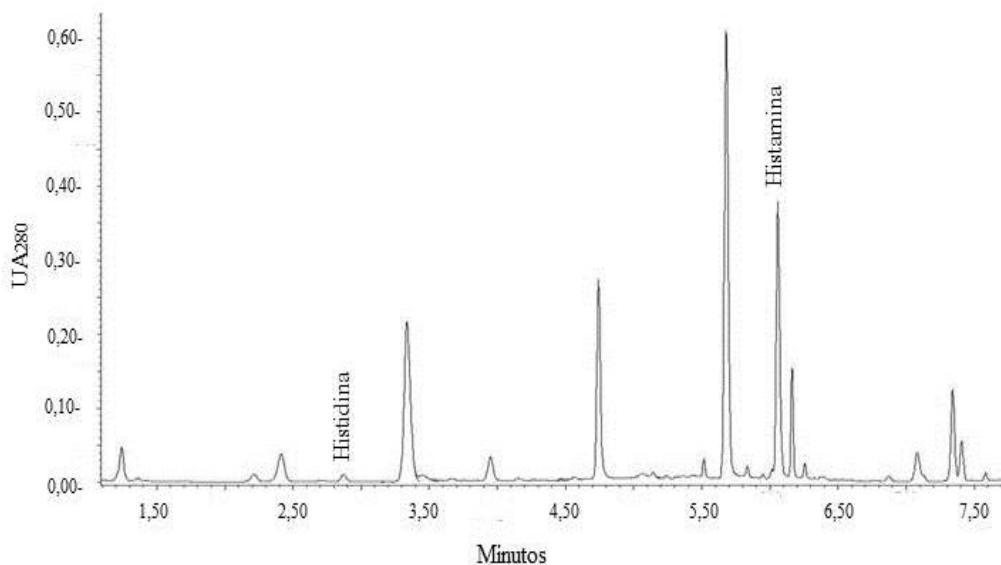
**Figura 7. Efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina en *L. parabuchneri* IPLA 11122.** Las células se cultivaron durante 35 h a 37 °C en medio MRS suplementado con 10 mM de histidina en condiciones de anaerobiosis (cuadros blancos) y aerobiosis con agitación (cuadros negros). Se recogieron muestras cada 3 h y se determinó (A) el crecimiento bacteriano mediante el análisis de la absorbancia a 600 nm (DO<sub>600</sub>) y (B) la producción de histamina mediante el análisis por UHPLC. Los datos muestran la media de triplicados independientes. Las barras indican la desviación estándar.

Como se observa en la Figura 7 A, el crecimiento de la cepa *L. parabuchneri* IPLA 11122 fue mayor cuando se cultivó en aerobiosis con agitación que cuando se cultivó en condiciones de ausencia de oxígeno (anaerobiosis), ya que la DO<sub>600</sub> a las 24 h



fue de 5,69 y 3,31, respectivamente. El máximo crecimiento de la cepa en ambas condiciones fue a las 34 h, momento en el que los cultivos alcanzaron una  $DO_{600}$  de 6,19 en aerobiosis con agitación y una  $DO_{600}$  de 3,74 en anaerobiosis. Estos datos parecen indicar que el oxígeno podría favorecer el crecimiento de la cepa *L. parabuchneri* IPLA 11122.

Seguidamente, se cuantificó la histamina acumulada en las muestras mediante análisis UHPLC (Figura 7 B). En la Figura 8 se muestra el cromatograma obtenido del análisis por UHPLC de una de estas muestras en el que se observa el pico correspondiente a la histidina presente en el medio de cultivo y que aún no había sido descarboxilada a histamina (tiempo de retención 2,920 min) y el pico correspondiente a la histamina acumulada (tiempo de retención 6,118 min).



**Figura 8. Cromatograma obtenido mediante UHPLC de una muestra de un cultivo de *L. parabuchneri* IPLA 11122.** Se han marcado los picos cromatográficos correspondientes a la histidina y a la histamina. UA (Unidades de Absorbancia) a 280 nm.

Como se observa en la Figura 7 B, la cepa *L. parabuchneri* IPLA 11122 produjo histamina desde el inicio de la fermentación tanto en anaerobiosis como en aerobiosis con agitación. La concentración de histamina aumentó progresivamente en ambos cultivos hasta alcanzar un valor máximo de aproximadamente 8 mM después de 20 h de incubación. A partir de este tiempo, la concentración de histamina se mantuvo constante

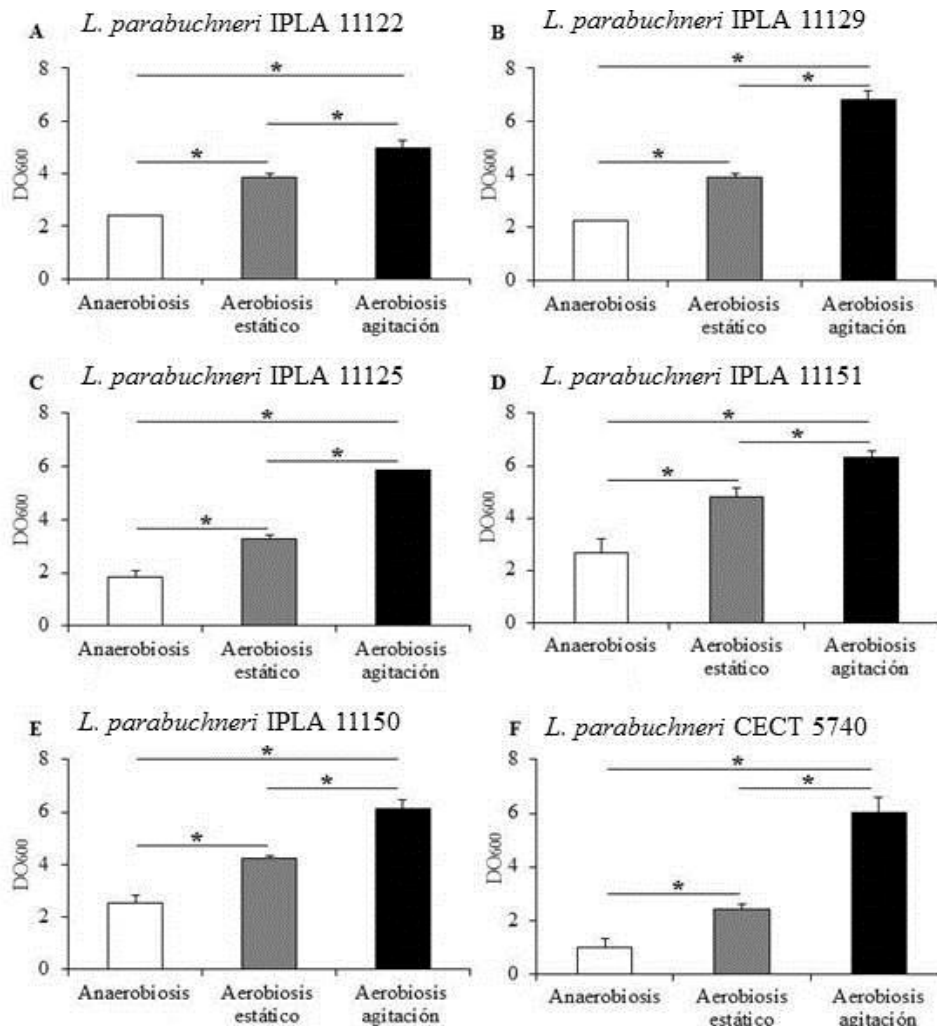


(datos no mostrados). Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas entre la histamina producida por los cultivos incubados en condiciones de anaerobiosis y los incubados en aerobiosis con agitación. Estos resultados sugieren que la producción de histamina podría estar favorecida en condiciones de ausencia de oxígeno, ya que aunque la producción de histamina fue similar en ambas condiciones de  $PO_2$ , la cepa *L. parabuchneri* IPLA 11122 mostró un menor crecimiento en ausencia que en presencia de oxígeno. Esto indica que los cultivos crecidos en anaerobiosis produjeron una cantidad de histamina mayor que los crecidos en presencia de oxígeno. Estos datos sugieren que el oxígeno podría ser un factor físico-químico que regulara la biosíntesis de esta AB en *L. parabuchneri*.

Para comprobar si el efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina era una característica exclusiva de la cepa *L. parabuchneri* IPLA 11122 o si, por el contrario, era una característica presente en otras cepas de *L. parabuchneri*, se analizó el efecto del oxígeno en el crecimiento y en la producción de histamina en otras 4 cepas de *L. parabuchneri* que habían sido aisladas de queso (IPLA 11129, IPLA 11125, IPLA 11150 y IPLA 11151) y en la cepa tipo *L. parabuchneri* CECT 5740. Para ello, los cultivos correspondientes de cada cepa se incubaron en MRS suplementado con 10 mM de histidina a 37 °C en tres condiciones con diferentes  $PO_2$  (de menor a mayor  $PO_2$ ): anaerobiosis, aerobiosis estático y aerobiosis con agitación. Tras 24 h de incubación se determinó el crecimiento de los cultivos mediante el análisis de la  $DO_{600}$ , así como la histamina acumulada durante este tiempo mediante análisis por UHPLC.

En la Figura 9 se muestran los resultados correspondientes al efecto del oxígeno en el crecimiento de las cepas de *L. parabuchneri* analizadas. Todas las cepas presentaron un crecimiento mayor en condiciones de mayor  $PO_2$ . De esta forma, se observó un crecimiento significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los cultivos que se incubaron en aerobiosis estático en comparación con los cultivos que se incubaron en anaerobiosis (Figura 9 A-F). Igualmente, se vio un crecimiento significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los cultivos que se incubaron en aerobiosis con agitación, en comparación con los que se incubaron en aerobiosis estático (Figura 9 A-F). Como era de esperar, los cultivos incubados en aerobiosis con agitación mostraron un crecimiento significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que los cultivos incubados en ausencia de oxígeno (anaerobiosis) (Figura 9 A-F). Estos resultados parecen confirmar el efecto del oxígeno

en el aumento del crecimiento en las cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina ensayadas y sugieren la posibilidad de que este efecto sea una característica específica de *L. parabuchneri*.

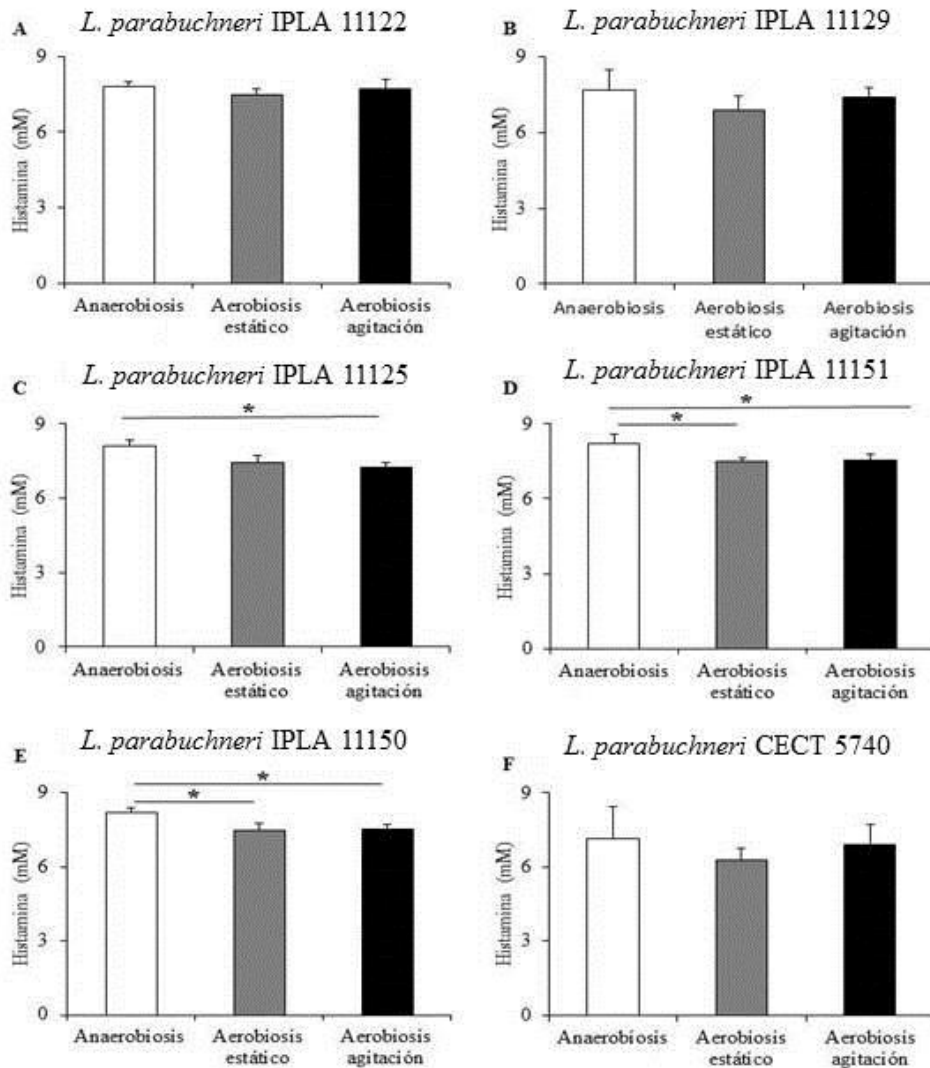


**Figura 9. Efecto del oxígeno en el crecimiento de diferentes cepas de *L. parabuchneri*.** Las células se cultivaron en medio MRS suplementado con 10 mM de histidina en condiciones de anaerobiosis (barra blanca), aerobiosis estático (barra gris) y aerobiosis con agitación (barra negra), durante 24 h a 37 °C. El crecimiento bacteriano se determinó mediante el análisis de la absorbancia a 600 nm (DO<sub>600</sub>). (A) *L. parabuchneri* IPLA 11122, (B) *L. parabuchneri* IPLA 11129, (C) *L. parabuchneri* IPLA 11125, (D) *L. parabuchneri* IPLA 11151, (E) *L. parabuchneri* IPLA 11150, (F) *L. parabuchneri* CECT 5740. Los datos muestran la media de triplicados independientes. Las barras indican la desviación estándar. \* $p < 0,05$ .



Seguidamente, se determinó la histamina acumulada en estos cultivos mediante análisis por UHPLC. Los resultados se muestran en la Figura 10. Los cultivos acumularon concentraciones de histamina que oscilaron entre 6,28 y 8,2 mM. Los cultivos de las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11122, *L. parabuchneri* IPLA 11129 y *L. parabuchneri* CECT 5740 no presentaron diferencias significativas en la histamina acumulada en condiciones de anaerobiosis, aerobiosis estático y aerobiosis con agitación (Figura 10 A, B y F). Sin embargo, los cultivos de las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11151 y *L. parabuchneri* IPLA 11150 acumularon una concentración de histamina significativamente mayor ( $p<0.05$ ) cuando se incubaron en ausencia de oxígeno (anaerobiosis), que cuando los cultivos se incubaron en aerobiosis estático (Figura 10 D y E). De forma similar, los cultivos de las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11125, *L. parabuchneri* IPLA 11151 y *L. parabuchneri* IPLA 11150 acumularon una concentración de histamina significativamente mayor ( $p<0.05$ ) cuando se incubaron en ausencia de oxígeno (anaerobiosis), que cuando los cultivos se incubaron en aerobiosis con agitación (Figura 10 C, D y E).





**Figura 10. Efecto del oxígeno en la producción de histamina en diferentes cepas de *L. parabuchneri*.** Las células se cultivaron en medio MRS suplementado con 10 mM de histidina en condiciones de anaerobiosis (barra blanca), aerobiosis estático (barra gris) y aerobiosis con agitación (barra negra) durante 24 h a 37 °C. Se determinó la producción de histamina en cada cultivo mediante el análisis por UHPLC. (A) *L. parabuchneri* IPLA 11122, (B) *L. parabuchneri* IPLA 11129, (C) *L. parabuchneri* IPLA 11125, (D) *L. parabuchneri* IPLA 11151, (E) *L. parabuchneri* IPLA 11150, (F) *L. parabuchneri* CECT 5740. Los datos muestran la media de triplicados independientes. Las barras indican la desviación estándar. \* $p < 0,05$ .

Los resultados indican que la producción de histamina en *L. parabuchneri* podría estar favorecida en ausencia de oxígeno, ya que aunque los cultivos incubados en anaerobiosis fueron los que mostraron el crecimiento más bajo (Figura 9 A-F, barra



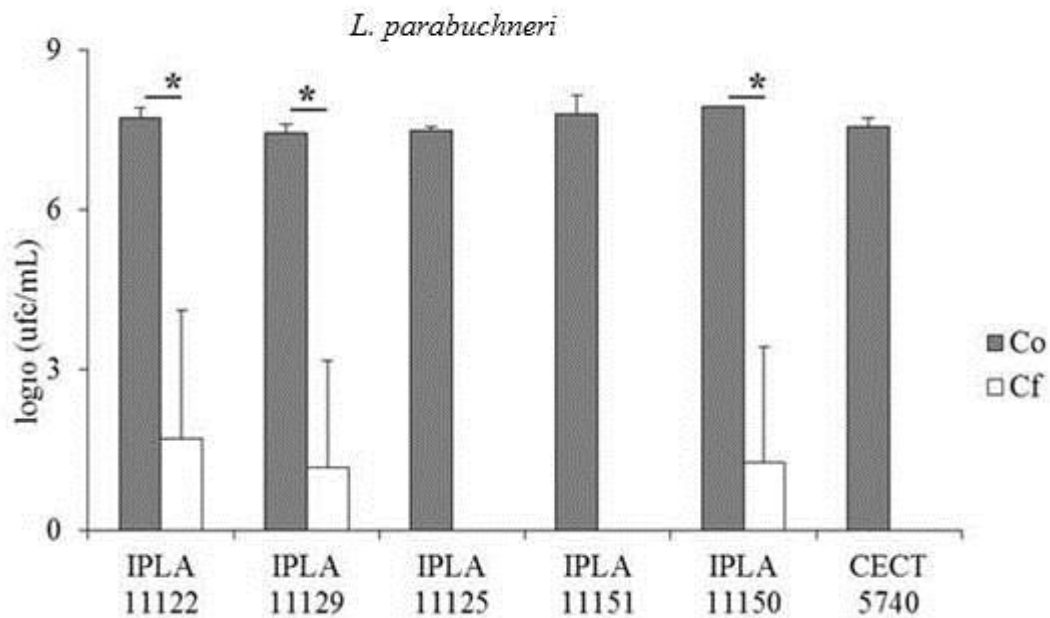
blanca), acumularon la misma, o incluso mayor, concentración de histamina (Figura 10 A-F, barra blanca) que los cultivos incubados en presencia de oxígeno (Figura 10 A-F, barras gris y negra). Los datos obtenidos sugieren que el oxígeno podría ser un factor físico-químico que regulara la biosíntesis de histamina en *L. parabuchneri*. En este sentido, sería interesante analizar el efecto del oxígeno en la actividad de la enzima HDC, así como en la regulación transcripcional de los genes biosintéticos de la ruta de la histidina descarboxilasa en este microorganismo.

Estos resultados podrían tener relevancia tecnológica en la industria láctea, en concreto en la conservación de los quesos, ya que hoy en día muchos de estos productos lácteos se conservan al vacío o en atmósferas modificadas. Los resultados de este trabajo parecen indicar que en ausencia de oxígeno *L. parabuchneri* muestra un menor crecimiento que en presencia de oxígeno, de manera que la conservación de los quesos al vacío o en atmósferas protectoras podría reducir o retrasar el crecimiento de esta bacteria productora de histamina. Sin embargo, la ausencia de oxígeno podría potenciar la biosíntesis de histamina por *L. parabuchneri*, lo que favorecería la producción de histamina en quesos previamente contaminados con este microorganismo y conservados al vacío o en atmósferas modificadas. Ya que la presencia o ausencia de oxígeno podría ser un factor que influyera en el acúmulo de histamina en quesos, sería interesante determinar el efecto del envasado al vacío y de las atmósferas modificadas en el acúmulo de esta AB en quesos.

### 8.3. Resistencia a la pasteurización de *L. parabuchneri*

Otro de los objetivos de este trabajo fue analizar la resistencia de *L. parabuchneri* a la pasteurización para determinar si este tratamiento térmico podría eliminar o reducir la presencia de estos microorganismos productores de histamina en la leche, que es la fuente principal de microorganismos con actividad descarboxilasa en el queso. Para ello, se inoculó en leche desnatada una concentración de *L. parabuchneri* alta, aproximadamente de  $10^8$  ufc/ml, que simula la población bacteriana que podría llegar a acumularse en leche cruda de mala calidad microbiológica (Ladero *et al.*, 2011b). Las muestras de leche se inocularon de forma independiente con cada una de las cepas de *L.*

*parabuchneri*, se sometieron al proceso de pasteurización y se determinó la supervivencia de estas bacterias mediante recuento en placa. Los resultados de supervivencia para cada una de las cepas se muestran en la Figura 11.



**Figura 11. Supervivencia a la pasteurización de diferentes cepas de *L. parabuchneri*.** Se comprobó la viabilidad de las cepas de *L. parabuchneri* IPLA 11122, IPLA 11129, IPLA 11125, IPLA 11151, IPLA 11150 y CECT 5740 tras el proceso de pasteurización (63 °C durante 30 min). Para cada una de las cepas se determinó el número de microorganismos (ufc/ml) antes (Co, barra gris) y después (Cf, barra blanca) de la pasteurización. Los datos muestran la media de triplicados independientes. Las barras indican la desviación estándar. \* $p < 0,05$ .

Las cepas de *L. parabuchneri* analizadas mostraron diferente sensibilidad al proceso de pasteurización. Las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11125, *L. parabuchneri* IPLA 11151 y *L. parabuchneri* CECT 5740 resultaron completamente sensibles al tratamiento, ya que no se obtuvo ninguna bacteria viable en los recuentos que se llevaron a cabo tras el proceso de pasteurización. Sin embargo, aunque en las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11122, *L. parabuchneri* IPLA 11129 y *L. parabuchneri* IPLA 11150 se observó una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de varias unidades logarítmicas (entre 6 a 7) en el número de microorganismos viables obtenidos



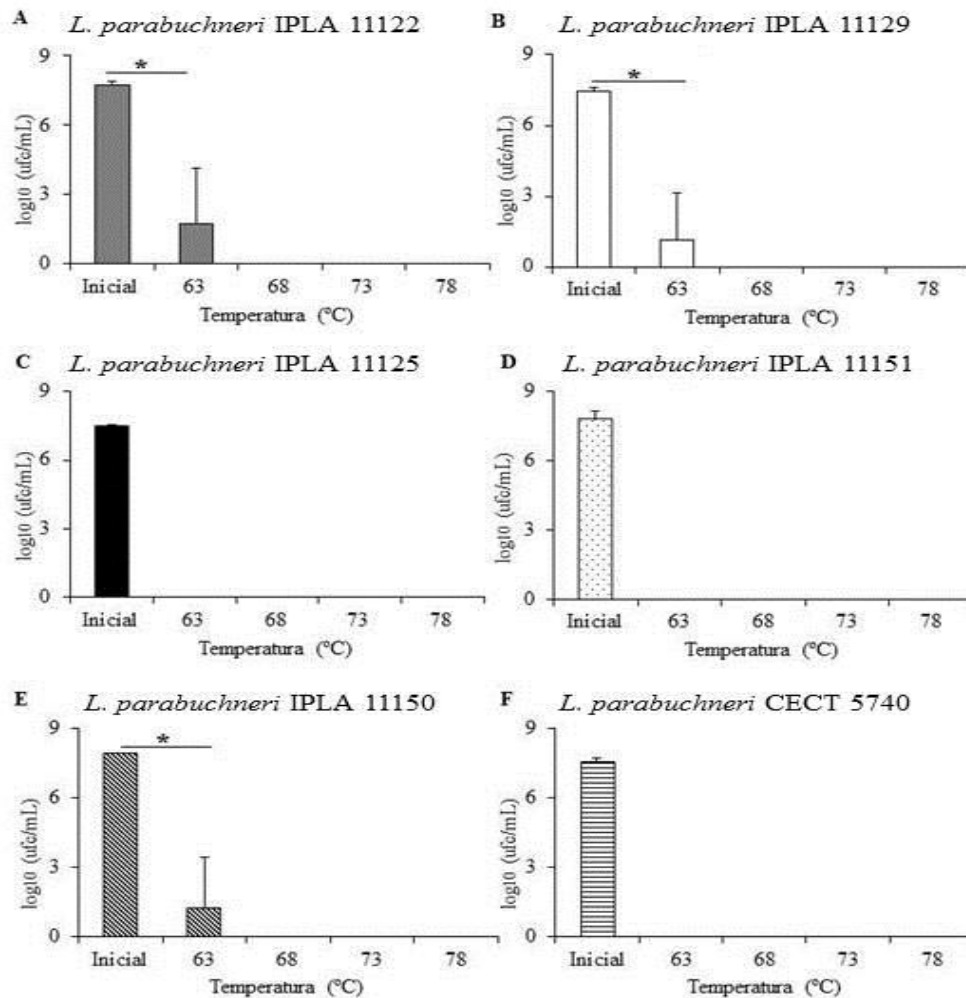
tras el proceso de pasteurización, mostraron cierta resistencia al tratamiento térmico. *L. parabuchneri* IPLA 11122 fue la cepa más resistente a la pasteurización, ya que mostró una reducción de células viables de unas 6 unidades logarítmicas, mientras que las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11129 y *L. parabuchneri* IPLA 11150 mostraron una reducción de células viables de unas 7 unidades logarítmicas. De forma similar, Ladero *et al.* (2011b) comprobaron que el microorganismo productor de histamina *L. parabuchneri* B301 (antiguamente clasificado como *L. buchneri* B301) y una cepa de otra especie de lactobacilo productora de tiramina y putrescina (*Lactobacillus curvatus* V16) resisten de forma parcial el proceso de pasteurización.

Estos resultados indican que la resistencia al tratamiento de pasteurización parece ser una característica dependiente de cepa en *L. parabuchneri*, ya que no todas las cepas analizadas mostraron el mismo grado de resistencia a este proceso. Los lactobacilos no son microorganismos que se describan de forma general como termorresistentes, aunque algunos autores han indicado que algunas cepas de este género pueden mostrar cierta resistencia a altas temperaturas, especialmente en ensayos realizados en leche, la cual tiene un conocido efecto protector (Jordan y Cogan, 1999).

#### 8.4. Resistencia térmica de *L. parabuchneri* a temperaturas superiores a la de pasteurización

Como se mostró en el apartado anterior, tres de las cepas analizadas de *L. parabuchneri* (*L. parabuchneri* IPLA 11122, *L. parabuchneri* IPLA 11129 y *L. parabuchneri* IPLA 11150) fueron parcialmente resistentes al tratamiento de pasteurización. Para determinar si la supervivencia de estas cepas parcialmente resistentes al proceso de pasteurización se podría reducir mediante el aumento de la temperatura del tratamiento térmico, se llevó a cabo un ensayo en el que se determinó la supervivencia de *L. parabuchneri* a temperaturas superiores a la de la pasteurización. Para ello, se prepararon tubos con leche inoculada de forma individual con cada una de las cepas de *L. parabuchneri*, tal y como se describió en el apartado anterior. Estas muestras se sometieron a temperatura de pasteurización (63 °C) y a temperaturas superiores (68, 73 y 78 °C) durante 30 min. Seguidamente, se determinó la

supervivencia de los microorganismos en la leche tratada mediante recuento en placa. Los resultados de supervivencia de las cepas después de los diferentes tratamientos térmicos se muestran en la Figura 12.



**Figura 12. Resistencia térmica de *L. parabuchneri* a temperaturas superiores a la de pasteurización.** Se comprobó la viabilidad de las cepas (A) *L. parabuchneri* IPLA 11122, (B) IPLA 11129, (C) IPLA 11125, (D) IPLA 11151, (E) IPLA 11150 y (F) CECT 5740 tras el proceso de pasteurización y tras el tratamiento térmico a temperaturas superiores a la de pasteurización (68, 73 y 78 °C). Los datos muestran la media de triplicados independientes. Las barras indican la desviación estándar. \* $p < 0,05$ .

Los resultados muestran que ninguna de las cepas ensayadas de *L. parabuchneri* fue capaz de resistir el tratamiento térmico a 68 °C o a temperaturas superiores (Figura 12 A-F). Las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11122, *L. parabuchneri* IPLA 11129 y *L.*



*parabuchneri* IPLA 11150 que habían mostrado cierta resistencia al proceso de pasteurización, no sobrevivieron al tratamiento térmico a 68 °C (Figura 12 A, B y E).

Estos resultados tienen una gran importancia tecnológica, ya que indican que elevando la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso de pasteurización se podrían eliminar de la leche de partida los microorganismos de la especie *L. parabuchneri*, lo que unido a una elaboración en condiciones higiénicas adecuadas evitaría la acumulación de histamina en quesos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que tratamientos térmicos a temperaturas superiores a la de pasteurización y por largos periodos de tiempo (30 min) pueden afectar a la calidad de la leche, lo que haría que no se pudieran utilizar en la industria láctea (Ladero *et al.*, 2011b). Sería interesante poder determinar la temperatura y el periodo de tratamiento mínimo que permitieran la eliminación de la especie *L. parabuchneri* de la leche con la que se elaboran los quesos y que, por lo tanto, evitaran la acumulación de histamina en estos alimentos.



# CONCLUSIONES





## 9. Conclusiones

- 1.- Las cepas de *L. parabuchneri* usadas en este estudio presentaron morfología bacilar en forma de bastón; se observaron bacilos aislados y largas cadenas de células sin dividir.
- 2.- Las células de las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11129 y *L. parabuchneri* IPLA 11151 presentaron cierta tendencia a la agregación.
- 3.- El oxígeno favoreció el crecimiento de todas las cepas de *L. parabuchneri* ensayadas.
- 4.- La ausencia de oxígeno favoreció la producción de histamina en todas las cepas de *L. parabuchneri* ensayadas.
- 5.- Las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11125, *L. parabuchneri* IPLA 11151 y la cepa tipo *L. parabuchneri* CECT 5740 fueron completamente sensibles al proceso de pasteurización, ya que no se obtuvieron células viables tras este tratamiento.
- 6.- Las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11122, *L. parabuchneri* IPLA 11129 y *L. parabuchneri* IPLA 11150 mostraron resistencia parcial al tratamiento de pasteurización.
- 7.- *L. parabuchneri* IPLA 11122 fue la cepa que mostró una mayor resistencia al proceso de pasteurización.
- 8.- Todas las cepas de *L. parabuchneri* ensayadas fueron inactivadas con tratamientos térmicos iguales o superiores a 68 °C.





## 10. Símbolos (y abreviaturas)

Símbolo o abreviatura	Significado
AB	Aminas Biógenas
BAL	Bacterias del Ácido Láctico
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
DAO	Diamino oxidasas
DEEMM	Dietiletoximetilen malonato
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica (absorbancia) a una longitud de onda de 600 nm
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
G+C	Guanina + Citosina
HDC	Histidina descarboxilasa
HNMT	Histamina-N-Metiltransferasa
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDAO	Inhibidores de las diamino oxidasas
IDFA	<i>International Dairy Foods Association</i>
IMAO	Inhibidores de las monoamino oxidasas
IPLA	Instituto de Productos Lácteos de Asturias
MAO	Monoamino oxidasas
PCO <sub>2</sub>	Presión de dióxido de carbono
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-DGGE	PCR seguida de electroforesis en gel en gradiente de desnaturalización
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PN <sub>2</sub>	Presión de nitrógeno
PO <sub>2</sub>	Presión de oxígeno
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real



<b>Símbolo o abreviatura</b>	<b>Significado</b>
QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
UE	Unión Europea
ufc	Unidades Formadoras de Colonias
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>



# BIBLIOGRAFÍA



## 11. Bibliografía

- Andic S, Genccelep H y S Kose. *Determination of biogenic amines in herby cheese*. International Journal of Food Properties. 2010; **13**:1300-14.
- Aquino G, Molina A y JA Arias. *Regulación por receptores H3 a histamina de la liberación de neurotransmisores en los ganglios basales: implicaciones para la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson*. Gaceta Médica de México. 2012; **148**:467-75.
- Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M y MC Vidal-Carou. *Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar*. Meat Science. 2001; **57**:215-21.
- Brugmann R, Wüthrich D, Berthoud H, Irmeler S y H Graber. *Detection of Lactobacillus parabuchneri*. 2016. Pat. ref: WO2016030507A1.
- Buňková L, Buňka F, Dráb V, Kráčmar S y V Kubáň. *Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyramine production by the Enterococcus durans CCDM 53*. European Food Research and Technology. 2012; **234**:973-9.
- Buňková L, Buňka F, Pollaková E, Podešvová T y V Dráb. *The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of Lactococcus lactis subsp. cremoris and Lactococcus lactis subsp. lactis*. International Journal of Food Microbiology. 2011; **147**:112-9.
- Carr FJ, Chill D y N Maida. *The lactic acid bacteria: a literature survey*. Critical Reviews in Microbiology. 2002; **28**:281-370.



- Chander H, Batish VK, Babu S y RS Singh. *Factors affecting amine production by a selected strain of Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Food Science. 1989; **54**:940-2.
- Comisión Europea. *Commission Regulation (EC) N\_ 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs*. Official Journal of the European Union. 2005:1-26.
- Cretenet M, Le Gall G, Wegmann U, Even S, Shearman C, Stentz R y S Jeanson. *Early adaptation to oxygen is key to the industrially important traits of Lactococcus lactis ssp. cremoris during milk fermentation*. BMC Genomics. 2014; **15**:1054.
- Dellaglio F, de Roissart H, Torriani S, Curk M y D Janssens. *Caractéristiques générales des bactéries lactiques*. In Bactéries Lactiques. Edited by H de Roissart, Luquet y FM Loriga. París. 1994.
- del Rio B, Ladero V, Redruello B, Linares DM, Fernández M, Martín MC y MA Álvarez. *Lactose-mediated carbon catabolite repression of putrescine production in dairy Lactococcus lactis is strain dependent*. Food Microbiology. 2015; **48**:163-70.
- del Rio B, Redruello B, Ladero V, Fernández M, Martín MC y MA Álvarez. *Putrescine production by Lactococcus lactis subsp. cremoris CECT 8666 is reduced by NaCl via a decrease in bacterial growth and the repression of the genes involved in putrescine production*. International Journal of Food Microbiology. 2016; **232**:1-6.
- Díaz M, del Rio B, Laredo V, Redruello B, Fernández M, Martín MC y MA Álvarez. *Histamine-producing Lactobacillus parabuchneri strains isolated from grated cheese can form biofilms on stainless steel*. Food Microbiology. 2016a; **59**:85-91.



Díaz M, Laredo V, del Rio B, Redruello B, Fernández M, Martín MC y MA Álvarez. *Biofilms-Forming Capacity in Biogenic Amine-Producing Bacteria Isolated from Dairy Products*. *Frontiers in Microbiology*. 2016b; **7**:1-10.

Díaz M, Ladero V, Redruello B, Sánchez-Llana E, del Rio B, Fernández M, Martín MC y MA Álvarez. *A PCR-DGGE method for the identification of histamine-producing bacteria in cheese*. *Food Control*. 2016c; **63**:216-23.

EFSA. *Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods*. *EFSA Journal*. 2011; **9**:2393.

EFSA. *Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update)*. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*. 2013; **11**:3449.

Fernández M, Álvarez MA y M Zúñiga. *Proteolysis and amino acid catabolism in lactic acid bacteria*. In *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications*. 2008:89-136.

Fernández M, del Rio B, Linares DM, Martín MC y MA Álvarez. *Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production*. *Journal of Dairy Science*. 2006; **89**:3763-9.

Fernández M, Linares DM, del Rio B, Ladero V y MA Álvarez. *HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms*. *Journal of Dairy Research*. 2007; **74**:276-82.

Flockhart DA. *Dietary restrictions and drug interactions with monoamine oxidase inhibitors: an update*. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2012; **1**:17-24.



- Halasz A, Barath A, Simonsarkadi, L y W Holzapfel. *Biogenic-amines and their production by microorganisms in food*. Trends Food Science and Technology. 1994; **5**:42-9.
- Jordan, KN y TM Cogan. *Heat resistance of Lactobacillus spp. isolated from Cheddar Cheese*. Letters in Applied Microbiology. 1999; **29**:136-40.
- Komprda T, Smela D, Pechova P, Kalhotka L, Stencil J y B Klejdus. *Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages*. Meat Science. 2004; **67**:607-16.
- Konings WN, Lolkema JS, Bolhuis H, vanVeen, HW, Poolman B y AJM Driessen. *The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance*. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 1997; **71**:117-28.
- Ladero V, Calles-Enrriquez M, Fernández M y MA Álvarez. *Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines*. Current Nutrition and Food Science. 2010; **6**:145-56.
- Ladero V, Coton M, Fernández M, Buron N, Martín MC, Guichard H, Coton E y MA Álvarez. *Biogenic amines content in Spanish and French natural ciders: application of qPCR for quantitative detection of biogenic amine-producers* Food Microbiology. 2011a; **28**:554-61
- Ladero V, Fernández M, Calles-Enrriquez M, Sánchez-Llana E, Cañedo E, Martín MC y MA Álvarez. *Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci?* Food Microbiology. 2012; **30**:132-8.
- Ladero V, Linares DM, Fernández M y MA Álvarez. *Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content*. Food Research International. 2008; **41**:1015-9.



- Ladero V, Sánchez-Llana E, Fernández M y MA Álvarez. *Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions*. International Journal of Food Science and Technology. 2011b; **46**:516-21.
- Leroy F y L de Vuyst. *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry*. Trends in Food Science and Technology. 2004; **15**:67-78.
- Linares DM, del Rio B, Ladero V, Martínez N, Fernández M, Martín MC y MA Álvarez. *Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products*. Frontiers in Microbiology. 2012; **3**:180.
- Linares DM, del Rio B, Redruello B, Ladero V, Martín MC, Fernández M, Ruas-Madiedo P y MA Álvarez. *Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine*. Food Chemistry. 2016; **197**:658-63.
- Linares DM, Fernández M, Martín MC y MA Álvarez. *Tyramine biosynthesis in Enterococcus durans is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine concentration*. Microbial Biotechnology. 2009; **2**:625-33.
- Linares DM, Martín MC, Ladero V, Álvarez MA y M Fernández. *Biogenic amines in dairy products*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011; **51**:691-703.
- Maintz L y N Novak. *Histamine and histamine intolerance*. The American Journal of Clinical Nutrition. 2007; **85**:1185-96.
- Makarova KS y EV Koonin. *Evolutionary genomics of lactic acid bacteria*. Journal of Bacteriology. 2007; **189**:1199-1208.
- Marcobal Á, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV y R Muñoz. *A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the*





*lactic acid bacteria Lactobacillus brevis CECT 4669 and Enterococcus faecium BIFI-58. Research in Microbiology. 2006; 157:417-24.*

Moinard C, Cynober L y JP de Bandt. *Polyamines: metabolism and implications in human diseases. Clinical Nutrition. 2005; 24:184-97.*

Molenaar D, Bosscher JS, Ten Brink B, Driessen AJM y WN Konings. *Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine-histamine antiport in Lactobacillus buchneri. Journal of Bacteriology. 1993; 175:2864-70.*

Novella-Rodríguez S, Veciana-Nogues MT, Roig-Sagues AJ, Trujillo-Mesa AJ y MC Vidal-Carou. *Influence of starter and non-starter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. Journal of Dairy Science. 2002; 85: 2471-78.*

Novella-Rodríguez S, Veciana-Nogues, MT, Roig-Sagues, AJ, Trujillo-Mesa AJ y MC Vidal-Carou. *Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. Journal of Dairy Research. 2004; 71:245-52.*

Önal, A. *A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. Food Chemistry. 2007; 103:1475-86.*

Pérez M, Calles-Enríquez M, Nes I, Martín MC, Fernández M, Ladero V y MA Álvarez. *Tyramine biosynthesis is transcriptionally induced at low pH and improves the fitness of Enterococcus faecalis in acidic environments. Applied Microbiology and Biotechnology. 2014; 99:3547-58.*

Rauscher-Gaberning E, Grossgut R, Bauer F y P Paulsen. *Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. Food Control. 2009; 20:423-29.*



- Redruello B, Ladero V, Cuesta I, Álvarez-Buylla JR, Martín MC, Fernández M y MA Álvarez. *A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent.* Food Chemistry. 2013; **139**:1029-35.
- Schelp E, Worley S, Monzingo AF, Ernst S y JD Robertus. *pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in Lactobacillus 30a.* Journal of Molecular Biology. 2001; **306**:727-32.
- Shalaby AR. *Significance of biogenic amines to food safety and human health.* Food Research International. 1997; **29**:675-90.
- Spano G, Russo P, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Alexandre H, Grandvale C, Coton E, Coton M, Barnavon L, Bach B, Rattray F, Bunte A, Magni C, Ladero V, Álvarez MA, Fernández M, Lopez P, de Palencia PF, Corbi A, Trip H y JS Lolkema. *Biogenic amines in fermented foods.* European. The American Journal of Clinical Nutrition. 2010; **64**:95-100.
- Taylor SL. *Histamine poisoning: Toxicology and clinical aspects.* CRC Critical Reviews in Toxicology. 1986; **17**:91-128.
- Uemura T, Stringer DE, Blohm-Mangone KA y EW Gerner. *Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract.* American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2010; **299**.
- Vidal C y ML Latorre. *Aminas biógenas: nuevas perspectivas para unos peligros clásicos de algunos alimentos.* Agència Catalana de Seguretat Alimentària. 2014:1-6.



Wolken WA, Lucas PM, Lonvaud-funel A y JS Lolkema. *The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in Lactobacillus brevis*. Journal of Bacteriology. 2006; **188**:2198-206.