

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA

ALIMENTARIA

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS
PRODUCTORAS DE HISTAMINA EN
QUESO”**

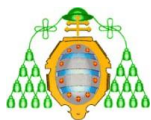
PROYECTO FIN DE MASTER

POR

MARÍA DÍAZ GARCÍA

JULIO, 2012





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



TUTORES:

Dr. D. Miguel Ángel Álvarez González (IPLA-CSIC)
Dr. Dña. M. Cruz Martín Martín (IPLA-CSIC)
Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **María Díaz García** ha realizado bajo mi dirección el Proyecto de Investigación al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, promoción 2011-2012.

Oviedo, de Julio de 2012

D. Miguel A. Álvarez González

Dña. M. Cruz Martín Martín

D. Manuel Rendueles de la Vega

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores, el Dr. Miguel A. Álvarez y la Dra. M. Cruz Martín, el haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo, así como el haberme guiado y ayudado en la realización de este proyecto; en especial a M. Cruz, gracias por tu tiempo y dedicación. A ambos, gracias por la confianza depositada en mí.

Al Dr. Manuel Rendueles por aceptar ser cotutor de este trabajo.

A la Dra. Clara González de los Reyes-Gavilán, directora del IPLA, por permitir la realización de este proyecto en el centro.

A mis compañeros de laboratorio, porque con una compañía así siempre apetece llegar al trabajo. Gracias a Marta y Noe, por todos los buenos ratos dentro y fuera del laboratorio, a Víctor y María, por preocuparos por mi trabajo y echarme una mano siempre que fue necesario, y en especial a Esther, no sólo por ayudarme durante este trabajo, sino por haberme enseñado desde mis inicios en el laboratorio, por todos los días buenos y sobre todo porque siempre me animaste en los “no tan buenos”.

También gracias a mis compañeros del LAE, Dani, Bea y Patri por su interés en mi trabajo y en especial a Bego por toda la ayuda prestada con los cromatogramas.

A todo el personal del IPLA que de alguna forma han ayudado a la realización de este proyecto.

A mis compañeros del máster, especialmente a Arancha, por hacer que la rutina de ir a clase fuese mucho mejor.

Y por último, a mis amigos que siempre han escuchado mis quebraderos de cabeza, aunque no llegasen a entenderlos, y a mis padres, que nunca han dejado de apoyarme.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABLAS.....	IV
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	6
2.1 BACTERIAS DEL ACIDO LÁCTICO.....	7
2.2 AMINAS BIÓGENAS.....	8
2.3 MÉTODOS PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE ABs EN PRODUCTOS LÁCTEOS.....	15
2.4 HISTAMINA.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 MICROORGANISMOS.....	22
3.2 CONDICIONES DE CULTIVO.....	22
3.3 ANÁLISIS DE ABs POR UHPLC.....	22
3.4 AISLAMIENTO DE CEPAS.....	23
3.5 SELECCIÓN DE CEPAS.....	24
3.6 MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN.....	25
3.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSANTE (PFGE).....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5. CONCLUSIONES.....	50
6. BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

Las aminas biógenas (ABs) son bases nitrogenadas orgánicas de bajo peso molecular, producidas por la descarboxilación de algunos aminoácidos, que pueden acumularse en los alimentos debido al metabolismo de determinados microorganismos. Las ABs se encuentran en una gran variedad de alimentos y bebidas, incluyendo los productos lácteos, principalmente el queso, que pueden acumular cantidades muy elevadas de estas sustancias. Las más importantes son la histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y β - feniletilamina. De todas ellas, la histamina es la que posee mayor actividad biológica, causando reacciones toxicológicas cuando se consumen alimentos con grandes cantidades de este compuesto. Algunos quesos pueden acumular una concentración de histamina superior a 1.000 mg por kilogramo de queso, debido principalmente a la acción de microorganismos Gram positivos del grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL). A pesar de existir quesos con concentraciones muy elevadas de histamina, hasta la actualidad sólo se ha descrito una cepa aislada de queso productora de esta sustancia: *Lactobacillus buchneri* B301. En este trabajo se han aislado 1910 microorganismos procedentes de 4 quesos diferentes. De todos ellos se han identificado 8 cepas pertenecientes a 3 especies diferentes del género *Lactobacillus*, capaces de producir histamina. Estas cepas han sido caracterizadas genotípicamente por secuenciación del ADNr 16S, macrorrestricción-PFGE y secuenciación del gen histidina descarboxilasa (*hdcA*).

ABSTRACT

Biogenic amines (BAs) are low molecular weight organic nitrogenous bases produced by decarboxylation of some amino acids that can accumulate in foods due to the metabolism of certain microorganisms. BAs are present in a wide range of foods and beverages, including dairy products, mainly cheeses, which can accumulate high amounts of these substances. The most important BAs are histamine, tyramine, putrescine, cadaverine and β -phenyl ethylamine. Of these, histamine has the highest biological activity. The consumption of food with high amounts of histamine can lead to a toxicological reaction. Some cheeses can accumulate more than 1,000 mg of histamine per kilogram of cheese, principally generated by lactic acid bacteria (LAB). Cheeses can have large amounts of histamine, although, only a strain isolated from cheese has been described: *Lactobacillus buchneri* B301. In this work, 1910 microorganisms from 4 different cheeses were isolated. From all of them, have been identified 8 strains, belonging to three different species of the genus *Lactobacillus*, with the ability to produce histamine. A genetic characterization of these strains has been made by sequencing of the 16S DNAr, PFGE-macrorrestriction and sequencing of the histidine decarboxylase gene (*hdcA*).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Reacciones de descarboxilación implicadas en la biosíntesis de aminas biógenas.	9
2	Ruta de síntesis de putrescina a partir de arginina.	9
3	Estructura química y clasificación de las ABs y poliaminas más frecuentes en alimentos.	11
4	Reacción de detoxificación de ABs catalizada por amino oxidasas.	12
5	Estructura de la HDC dependiente de piruvoil a pH 8 de <i>Lactobacillus saerimneri</i> 30a.	18
6	Comparación de la organización genética de la región histamina descarboxilasa de diferentes bacterias.	19
7	Cromatograma obtenido mediante UHPLC de la muestra de queso Cabrales E.	33
8	Cultivos en medio de descarboxilación de cepas productoras y no productoras de histamina.	37
9	Cromatograma obtenido mediante análisis por TLC de los sobrenadantes de los aislados del queso Emmental 1, crecidos en medio suplementado con histidina.	39
10	Cromatograma obtenido mediante análisis por TLC de los sobrenadantes de los aislados del queso Cabrales E, crecidos en medio suplementado con histidina.	40
11	PFGE. Perfiles generados por <i>Sfi</i> I a partir de los aislados de <i>L. reuteri</i> .	42
12	PFGE. Perfiles generados por <i>Apa</i> I.	44
13	PFGE. Perfiles generados por <i>Not</i> I.	45
14	Árbol filogenético de las secuencias de <i>hdcA</i> de las cepas.	46
15	Comparación de las secuencias de <i>hdcA</i> de las cepas aisladas.	48

LISTA DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo, su función, la fuente y la secuencia	27
2	Concentración de histamina (mg kg^{-1}) y estimación de las ufc g^{-1} de queso productoras de histamina en las muestras de queso	34
3	Resultado del cribado de aislados productores de histamina en medio de descarboxilación de histidina	37

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AB	Amina biógena
AD	Arginina descarboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
AgDI	Agmatina deiminasa
ARN	Ácido ribonucleico
BAL	Bacterias del ácido láctico
Ct	Ciclo umbral
DAO	Diamino oxidasa
DEEM	Dietoximetilen malonato
EC	European Union Comission
EFSA	Europeac Food Safety Comission
FDA	Food and Drug Comission
GRAS	Generalmente consideradas como seguras
HDC	Histidina descarboxilasa
HNMT	Histamina-N-metiltransferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IDAO	Inhibidores de la diamino oxidasa
IMAO	Inhibidores de la monoamino oxidasa
MAO	Monoamino oxidasa
o/n	Overnight
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsante
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PTC	Putrescina transcarbamilasa
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
TDPA	Ácido tiodipropionico
TLC	Cromatografía en capa fina
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta resolución

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado la preocupación, tanto por parte del consumidor como de las autoridades sanitarias, por conseguir alimentos carentes de sustancias tóxicas o potencialmente perjudiciales para la salud, como es el caso de las aminas biógenas (ABs). Las ABs son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos y pueden acumularse en los alimentos en grandes concentraciones debido a la actividad microbiana. Estas sustancias se encuentran de forma natural en animales y plantas. Desde el punto de vista biológico, las AB son moléculas con funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos. En células procariotas se les atribuye dos funciones principales. La primera sería la protección frente a pH ácido, derivada del consumo de protones durante las reacciones de descarboxilación de aminoácidos (Silla Santos, 1996; Schelp *et al.*, 2001; van de Guchte *et al.*, 2002). La segunda sería la obtención de energía, como consecuencia del gradiente de protones generado por el antiporte amina/aminoácido (Spano *et al.*, 2010; Linares *et al.*, 2011). En el ser humano están implicadas en procesos como la actividad cerebral, la regulación de la temperatura corporal y el pH estomacal, secreción de ácido gástrico, la respuesta inmune y el control del crecimiento y diferenciación celular. Sin embargo, un consumo excesivo de estas sustancias puede inducir reacciones adversas como náuseas, dolor de cabeza, erupciones y cambios en la presión sanguínea (Ladero *et al.*, 2010a).

La principal fuente de ABs exógenas es la dieta, a través de la ingesta de alimentos y bebidas con altas concentraciones de estos compuestos (Shalaby, 1996; Silla Santos, 1996, Premont *et al.*, 2001). Las ABs suelen acumularse en pescado, productos de pescado y alimentos y bebidas fermentados, debido a la acción de bacterias capaces de descarboxilar determinados aminoácidos. En alimentos, las más importantes son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y feniletilamina, que son producto de la descarboxilación de la histidina, tirosina, ornitina, lisina y fenilalanina respectivamente. La putrescina también puede formarse por deiminación de la agmatina. De todas estas, la más importante implicada en intoxicaciones alimentarias es la histamina, ya que es la de mayor actividad biológica (Bodmer *et al.*, 1999).

Las intoxicaciones por histamina se conocen también como escombroidosis, debido a la asociación de esta enfermedad con el consumo de pescados de la familia de los escombridos (Taylor, 1983). En el pescado y sus derivados, la histamina es sintetizada

principalmente por bacterias Gram negativas, consideradas contaminantes y asociadas a una mala conservación del alimento. Sin embargo, en productos fermentados, las bacterias responsables de la síntesis de histamina son en su mayoría bacterias Gram positivas del grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL), las cuales están implicadas en la fermentación y maduración del producto (Linares *et al.*, 2011). La histamina se genera por descarboxilación del aminoácido histidina gracias a la acción del enzima histidina descarboxilasa (HDC). En la naturaleza existen dos tipos de HDC, las dependientes del cofactor piridoxal-5'-fosfato, que engloban las HDC de eucariotas y bacterias Gram negativas y las dependientes de la formación del grupo piruvilo, que pertenecen a las bacterias Gram positivas. Entre los alimentos fermentados, los productos lácteos y en particular los quesos pueden acumular cantidades muy elevadas de histamina, superando incluso los 1.000 mg por kg de queso (Fernández *et al.*, 2007). En el ser humano, la histamina modula una variedad de funciones interaccionando con receptores específicos de las células diana, llamados H1, H2 y H3. Los receptores H1 se encuentran en el cerebro, donde están implicados en el control del ritmo circadiano, atención y cognición, y en tejidos periféricos, donde median las respuestas a histamina del músculo vascular y bronquial en procesos alérgicos (Jørgensen *et al.*, 2007). Los receptores H2, aunque están ampliamente distribuidos en los tejidos corporales, parecen tener un papel central sólo en la regulación de la secreción de ácido en el estómago. Responden a la presencia de histamina, causando secreción de ácido gástrico y la contracción del músculo liso intestinal (Ranganchari, 1992). Los receptores H3, son heterorreceptores en neuronas no-histaminérgicas en el sistema nervioso central y periférico. También han sido encontrados en células paracrinas e inmunes y en el músculo liso, donde han sido asociadas con hipersensibilidad inmediata y alérgica (Coruzzi *et al.*, 2001; Passani *et al.*, 2007). Cuando la histamina se une a estos receptores, provocan la contracción del músculo liso y la dilatación de los vasos sanguíneos y, por lo tanto, un flujo de suero sanguíneo a los tejidos periféricos, iniciando un proceso inflamatorio.

Debido a su importancia en el control fisiológico celular, la concentración de ABs presentes en las células y tejidos está fuertemente regulada a nivel de biosíntesis, catabolismo y consumo (Linsalata & Russo, 2008). La detoxificación de las ABs ingeridas en la dieta se produce en el tracto gastrointestinal, gracias a la acción de dos tipos de amino oxidasas específicas, la monoamino oxidasa (MAO) y la diamino oxidasa (DAO), que catalizan la desaminación oxidativa de las ABs generando un grupo

aldehído (Linares *et al.*, 2011). La desaminación de la histamina es llevada a cabo por el enzima DAO en el intestino (McCabe-Sellers *et al.*, 2006). Además, la detoxificación de la histamina también puede llevarse a cabo mediante metilación o acetilación (Taylor, 1986; Lehane & Olley, 2000).

A pesar de la existencia de este sistema detoxificador, la ingesta de ABs puede causar síntomas clínicos, dependiendo de la cantidad y variedad ingerida, la susceptibilidad del individuo y el nivel de actividad detoxificadora del intestino. Esta actividad puede estar reducida por factores genéticos o por estar bajo la influencia de compuestos inhibidores de la MAO o la DAO (IMAO e IDAO), como son algunos antidepresivos o las isoflavonas (y sus metabolitos) (McCabe-Sellers *et al.*, 2006). Cuando por alguna de estas razones la histamina llega al torrente sanguíneo se producen unos síntomas similares a los observados en las reacciones alérgicas (dolor de cabeza, sudores, secreción nasal, rubor facial, erupciones faciales, mareos, sarpullidos, edema, urticaria, dificultad para tragar, diarrea, estrés respiratorio, broncoplasma, aumento del gasto cardíaco, taquicardia, extrasístoles y desórdenes de la presión sanguínea), lo que puede conducir a una incorrecta diagnosis. Sin embargo, una intoxicación puede distinguirse si no hay historial de alergia previa, cuando hay un brote que incluya diferentes pacientes durante un corto periodo de tiempo y cuando la comida ingerida es sospechosa de contener altas concentraciones de histamina (Taylor, 1985).

En cuanto a las cantidades que pueden provocar una reacción adversa en el ser humano, sólo existe un número limitado de estudios sobre la dosis-respuesta causada por la histamina alimentaria. Cuando los niveles de histamina están en un rango de 6 a 25 mg/comida, no aparece efecto toxicológico. Sin embargo, se ha visto que la ingesta de 75 mg de histamina causa síntomas de intoxicación en gente sana (Wöhrl *et al.*, 2004; Rauscher-Gabernig *et al.*, 2009). La ingesta de alimentos con una concentración de histamina igual o superior a 400 mg kg⁻¹ se considera peligrosa para la salud (Taylor, 1985). El consumo de alimentos con concentraciones de 1.000 mg kg⁻¹ de histamina está asociado con diversas intoxicaciones (Rauscher-Gabernig *et al.*, 2009).

Los límites de ABs son difíciles de establecer, ya que sus efectos dependen de la presencia de compuestos moduladores y de la eficacia del sistema detoxificador del individuo. Por ejemplo, la acción de la histamina cuando es ingerida en quesos curados es mayor que la producida por una cantidad equivalente de histamina en solución acuosa (Taylor, 1986). Para los productos del pescado existen límites claros en el contenido de histamina (European Union Commission (EC) n°2073/2005 y la “Food and

Drug Administration” USA (FDA, 2001)), que son de 200 mg kg⁻¹ de pescado fresco y hasta 400 mg kg⁻¹ en productos de pescado ahumados. Sin embargo, sólo existen recomendaciones en cuanto a los límites para otros alimentos (p. ej. 100 mg de histamina por kg de alimento, o 2 mg de histamina por litro de bebida alcohólica) (Linares *et al.*, 2011).

A pesar de no existir unos límites legales claros, existe un consenso general respecto a la necesidad de que el contenido de histamina en los alimentos se reduzca al máximo. Existen diversos métodos para determinar la concentración de esta sustancia en productos alimenticios, incluyendo métodos rápidos de detección: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases, método capilar electroforético (CE) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Önal A, 2007). No obstante, para prevenir la síntesis y acumulación de histamina durante la fabricación, deben tenerse en cuenta los factores tecnológicos que afectan su contenido, como la presencia del aminoácido histidina o las condiciones ambientales durante la fabricación y almacenamiento (Linares *et al.*, 2011). Sin embargo, el factor esencial para la producción de histamina es la presencia de microorganismos con actividad histidina descarboxilasa.

Como ya mencionamos anteriormente, entre los productos fermentados, el queso es uno de los alimentos que acumula mayores concentraciones de histamina. Se ha desarrollado un método molecular independiente de cultivo para la detección temprana y cuantificación de microorganismos productores de histamina, que se puede utilizar tanto en la leche, como en los distintos pasos de la fabricación del queso e incluso en el producto final. Este método se basa en la detección y cuantificación del gen de la histidina descarboxilasa (*hdcA*) mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (Fernández *et al.*, 2006; Ladero *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de existir un método de detección, apenas existe conocimiento sobre cuáles son los microorganismos implicados en la síntesis de histamina en quesos. Hasta el momento sólo se ha conseguido aislar a partir de queso una cepa con actividad histidina descarboxilasa: *L. buchneri* B301 (Joosten & Northolt, 1987). Por este motivo, y dada la importancia que tiene el conocimiento de las bacterias implicadas en la síntesis de histamina para evitar su acumulación en quesos, el objetivo de este trabajo es aislar bacterias productoras de histamina a partir de queso, identificarlas y caracterizarlas genéticamente.



CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1 BACTERIAS DEL ACIDO LÁCTICO

Las BAL son un grupo heterogéneo de microorganismos que incluye diversos géneros caracterizados por la producción de ácido láctico como consecuencia de la fermentación de azúcares. Éste puede producirse por dos vías. En la primera, la vía homofermentativa, se forma mayoritariamente ácido láctico como producto de la fermentación, mientras que, en la segunda, la vía heterofermentativa, puede producirse además dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético (Kandler, 1983).

Son bacterias Gram positivas, catalasa negativas, con bajo contenido G + C, no esporuladas, no pigmentadas e incapaces de reducir nitratos. En general son inmóviles aunque existe alguna excepción. Son bacterias anaerobias aerotolerantes o microaerófilas.

Las BAL son un grupo taxonómicamente heterogéneo (Makarova & Koovin, 2007) que incluye especies pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Weissella*. Debido principalmente a razones tecnológicas, en este grupo también se incluyen los géneros *Bifidobacterium* y *Propionibacterium*, a pesar de que presentan genomas con un contenido en G + C superior al resto de BAL (Stackebrandt & Teuber, 1988).

Estas bacterias sólo son capaces de crecer en ambientes nutricionales muy ricos y complejos dado que poseen una limitada capacidad biosintética y altos requerimientos nutricionales en cuanto a fuentes de carbono y nitrógeno. Las podemos encontrar en la superficie de plantas o formando parte de la microbiota normal del hombre y de los animales. Las BAL también forman parte de alimentos y bebidas fermentadas por lo que son consideradas como seguras, recibiendo la categoría GRAS (*Generally Recognised As Safe*). En este contexto juegan un importante papel como iniciadores de la fermentación. Como consecuencia de la producción de ácido láctico se origina un descenso de pH, que junto con la producción de agentes antimicrobianos como las bacteriocinas, contribuye a la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes, prolongando así la vida útil de los alimentos fermentados. Los géneros más frecuentemente utilizados en aplicaciones industriales son *Lactococcus* (leche), *Lactobacillus* (leche, carne, verduras, cereales), *Leuconostoc* (verduras y leche),

Pediococcus (vegetales y carne), *Oenococcus* (vino, cerveza, sidra...) y *Streptococcus* (leche) (Settanni & Moschetti, 2010).

Además de la producción de ácido láctico, las BAL contribuyen al desarrollo del aroma, sabor y textura, aportando así un valor añadido a los alimentos fermentados (Settanni & Moschetti, 2010). Algunas cepas son también conocidas por sus efectos beneficiosos para la salud del consumidor por sus características probióticas. Sin embargo, como consecuencia del metabolismo de alguno de estos microorganismos pueden producirse compuestos indeseados que generan aromas o sabores desagradables e incluso compuestos tóxicos como las aminas biógenas.

2.2 AMINAS BIÓGENAS

2.2.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Las ABs son bases nitrogenadas orgánicas con actividad biológica, formadas principalmente por la descarboxilación de determinados aminoácidos.

Las principales ABs presentes en alimentos y bebidas son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y β -feniletilamina, productos de la descarboxilación de la histidina, tirosina, ornitina, lisina y β -fenilalanina, respectivamente. Algunos autores incluyen a las poliaminas espermidina y espermina dentro del grupo de las AB, aunque otros consideran que no deberían pertenecer a este grupo ya que en su biosíntesis intervienen reacciones de condensación y descarboxilación. En la siguiente figura se muestran las principales reacciones de descarboxilación implicadas en la síntesis de ABs.

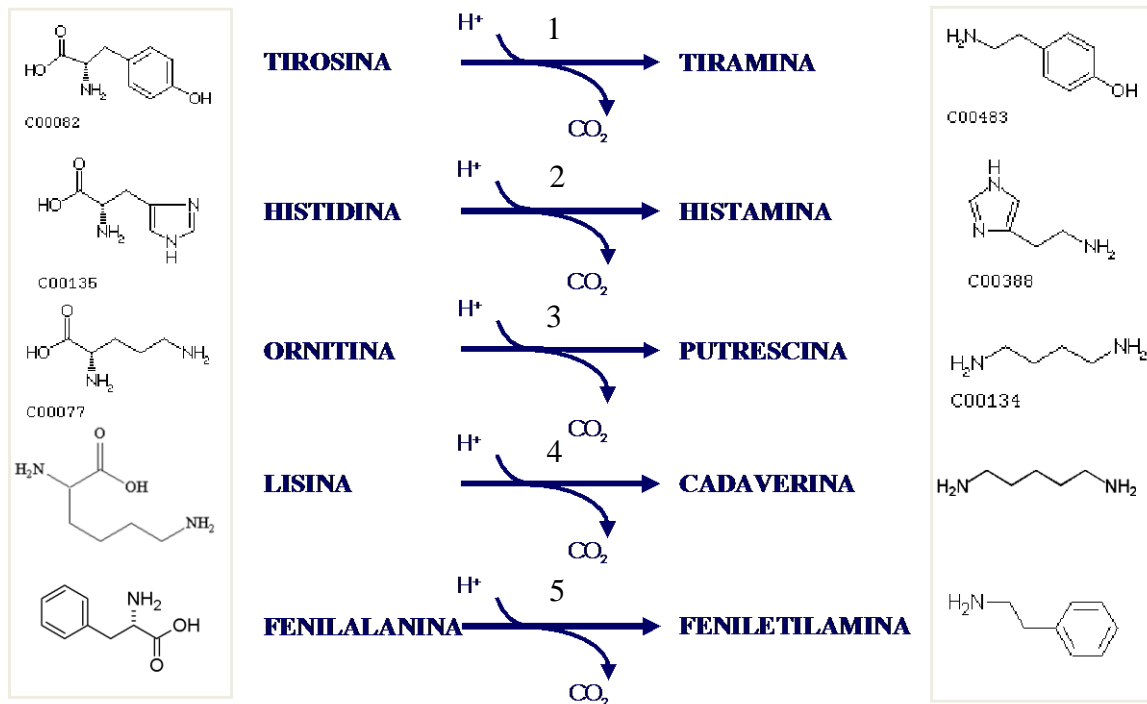


Figura 1: Reacciones de descarboxilación implicadas en la biosíntesis de aminas biógenas. **1:** tirosina descarboxilasa, **2:** histidina descarboxilasa, **3:** ornitina descarboxilasa **4:** lisina descarboxilasa, **5:** fenilalanina descarboxilasa.

Según su estructura química se dividen en alifáticas (putrescina, cadaverina, agmatina, espermina y espermidina), aromáticas (tiramina y β -fenilalanina) y heterocíclicas (histamina y triptamina). Según el número de grupos amino se pueden clasificar como monoaminas (tiramina y β -fenilalanina), diaminas (putrescina, cadaverina, histamina y triptamina) o poliaminas (agmatina, espermina y espermidina) (Linares *et al.*, 2011).

	MONOAMINAS	DIAMINAS	POLIAMINAS
--	------------	----------	------------

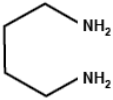
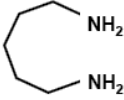
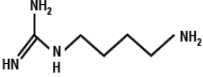
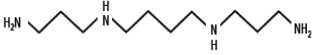
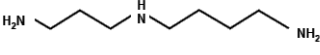
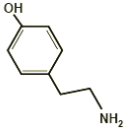
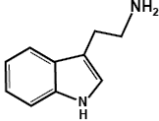
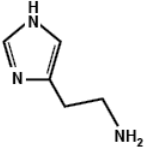
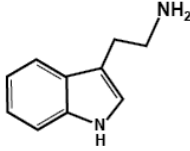
ALIFÁTICAS		<p>PUTRESCINA</p>  <p>CADAVERINA</p> 	<p>AGMATINA</p>  <p>ESPERMINA</p>  <p>ESPERMIDINA</p> 
AROMÁTICAS	<p>TIRAMINA</p>  <p>β-FENILETILAMINA</p> 		
HETEROCÍCLICAS		<p>HISTAMINA</p>  <p>TRIPTAMINA</p> 	

Figura 3: Estructura química y clasificación de las ABs y poliaminas más frecuentes en alimentos.

2.2.2 PAPEL FISIOLÓGICO

Las ABs son moléculas con funciones fisiológicas esenciales. En las células eucariotas estos compuestos actúan como precursores para la síntesis de hormonas, alcaloides, ácidos nucleicos y proteínas. Además, algunas ABs como histamina, triptamina, tiramina y algunas poliaminas actúan también como neuromoduladores, mientras que otros como la putrescina o la espermidina son necesarios en funciones biológicas críticas, como la modulación de la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Tabor & Tabor, 1985; Igarashi *et al.*, 2001). Además, la histamina está implicada en las respuestas locales del sistema inmune, actuando como el mediador responsable del desencadenamiento de las reacciones de hipersensibilidad inmediata y alérgica.

En células procariotas se les atribuyen dos funciones principales, relacionadas con las reacciones de descarboxilación responsables de la biosíntesis de estos compuestos. Una de estas funciones sería la de actuar como mecanismo de defensa frente a pH ácido. En la reacción de descarboxilación de un aminoácido se consume un protón y se secreta una amina y CO₂, ayudando al reestablecimiento del pH externo (Silla Santos, 1996; Schelp *et al.*, 2001; van de Guchte *et al.*, 2002). La segunda ventaja consistiría en que la producción de ABs constituiría una vía para obtener energía, ya que el antiporte electrogénico aminoácido/amina crearía un gradiente eléctrico o fuerza protón-motriz que podría ser especialmente importante en BAL, ya que carecen de cadena respiratoria (Spano *et al.*, 2010; Linares *et al.*, 2011).

2.2.5 EFECTOS TÓXICOS DE LAS ABs

Aunque las ABs sean necesarias para la realización de muchas funciones biológicas, el consumo de alimentos con elevado contenido en estos compuestos puede tener efectos adversos.

El ser humano posee un sistema detoxificador en el tracto gastrointestinal que metaboliza las ABs ingeridas y las transforma en compuestos menos activos. Los enzimas más importantes en este sistema son la monoamino oxidasa (MAO; EC 1.4.3.4) y la diamino oxidasa (DAO; EC 1.4.3.6), que catalizan la desaminación oxidativa de ABs generando un grupo aldehído. La histamina puede ser también detoxificada por metilación o por acetilación (Linares *et al.*, 2011).

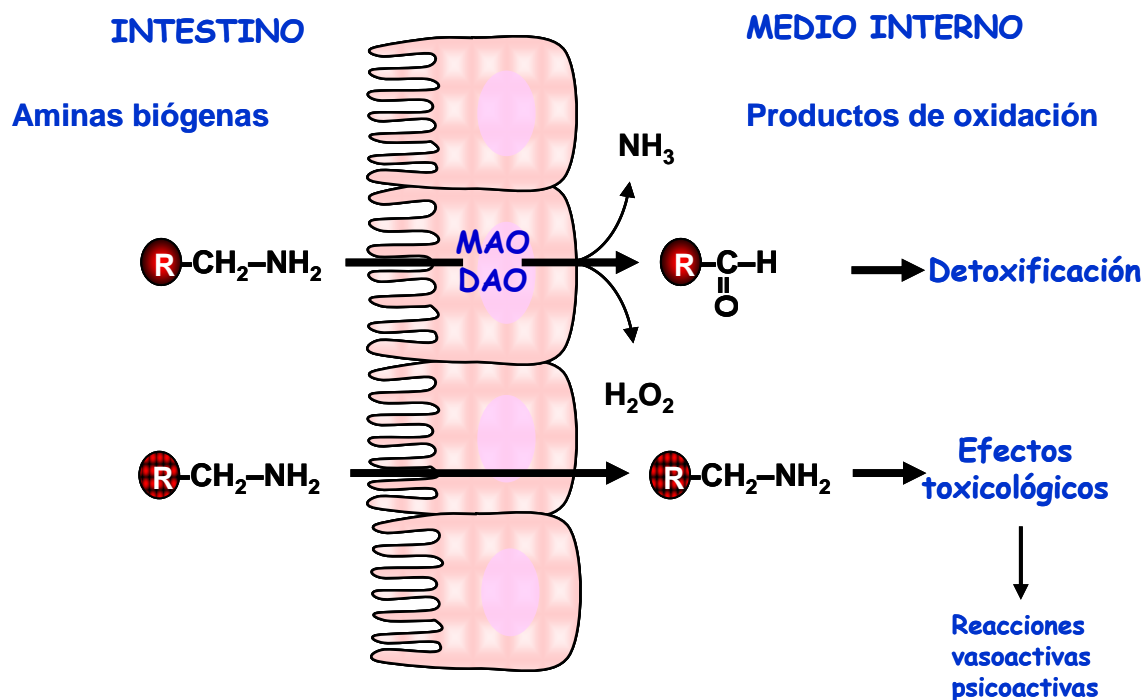


Figura 4: Reacción de detoxificación de ABs catalizada por amino oxidasas. En la reacción el grupo amino se oxida generando un grupo aldehído, amoníaco y agua oxigenada.

Sin embargo, cuando se ingiere una excesiva cantidad de ABs, el sistema detoxificador no es capaz de eliminarla totalmente y pasa al torrente sanguíneo, donde causa diversos problemas. Hay que tener en cuenta que existen personas especialmente sensibles a la ingesta de ABs debido a que su sistema detoxificador está afectado, bien por causas genéticas o por el consumo de sustancias inhibitoras de las amino-oxidasas (IMAO), como el alcohol o determinados fármacos antidepresivos (Ayhan *et al.*, 1999; Maijala *et al.*, 1993; Rice *et al.*, 1976; Treviño *et al.*, 1997). El establecimiento de límites de toxicidad de ABs es difícil, ya que depende de la capacidad detoxificadora de cada individuo. Además, algunas aminas actúan de forma sinérgica entre ellas, de manera que el efecto de unas puede ser potenciado por otras (Bjeldanes *et al.*, 1987; Maintz *et al.*, 2007).

Si se da alguna de estas circunstancias y las ABs pasan al torrente sanguíneo, pueden causar problemas circulatorios, como hipertensión (tiramina, triptamina y feniletilamina), hipotensión (putrescina y cadaverina), migrañas (tiramina y fenilalanina), braquicardia y liberación de adrenalina y noradrenalina. También pueden provocar síntomas de tipo digestivo como náuseas, vómitos y diarreas; trastornos

respiratorios, como sofocos y a menudo, síntomas alérgicos, especialmente en el caso de la histamina (Shalaby, 1996).

Las intoxicaciones alimentarias más frecuentes relacionadas con ABs están asociadas a histamina y tiramina. Las más conocidas son las intoxicaciones por histamina, también conocida como enfermedad escombroide ya que está relacionada con la ingestión de pescados pertenecientes a la familia *Scombridae*. En cuanto al queso, son frecuentes las intoxicaciones causadas por el alto contenido en tiramina, cuyo efecto se conoce como reacción del queso (Spano *et al.*, 2010).

Además de su efecto directo, algunas diaminas como la putrescina y la cadaverina, pueden reaccionar con aditivos alimentarios como los nitratos y nitritos (NOCs) para formar nitrosaminas, que son compuestos con efectos carcinogénicos (Shalaby, 1996).

2.2.3 ABs EN ALIMENTOS

Las ABs son compuestos que se encuentran de forma endógena en los alimentos, aunque normalmente a muy bajas concentraciones, ya que por sus funciones fisiológicas se sintetizan tanto en plantas como en animales. Sin embargo, pueden llegar a acumularse en altas concentraciones debido a que algunos microorganismos pueden llevar a cabo reacciones de descarboxilación de aminoácidos durante la fermentación, maduración o almacenaje de los alimentos (Shalaby, 1996).

La presencia de ABs en alimentos ha sido tradicionalmente utilizada como indicador de la calidad del producto, ya que elevados niveles de ciertas aminas indican actividad microbiana indeseada, lo que se relaciona con el deterioro del producto y/o fabricación defectuosa (Spano *et al.*, 2010). Sin embargo, su presencia en alimentos resulta aún más importante por ser responsables de distintos tipos de intoxicaciones alimentarias (Shalaby, 1996).

La acumulación de ABs se produce principalmente en pescado, productos de pescado y en alimentos y bebidas fermentados. En alimentos no fermentados es de destacar su presencia en pescados de la familia de los escómbridos (atún, caballa, bonito), donde se acumulan por la actividad descarboxilasa llevada a cabo por bacterias principalmente Gram negativas. Estas bacterias se consideran contaminantes y se relacionan con una mala conservación, por lo que una alta concentración de ABs es indicadora de forma indirecta, de la carga microbiana y por tanto de la frescura e higiene del producto (Bover Cid *et al.*, 2001, Komprda *et al.*, 2004).

Sin embargo, en bebidas y productos fermentados, las bacterias responsables de la producción de ABs son en su mayoría bacterias Gram positivas del grupo de las BAL, que forman parte del cultivo iniciador o de la microbiota secundaria, aunque no se pueden excluir las bacterias contaminantes Gram negativas. Dentro de los productos fermentados, son de destacar los productos lácteos, especialmente el queso, donde se pueden acumular elevados niveles de ABs. En este contexto, los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* incluyen cepas que han sido descritas como productoras de ABs (Linares *et al.*, 2011).

2.2.4 FACTORES IMPLICADOS EN LA ACUMULACIÓN DE ABs EN ALIMENTOS

La aparición y acumulación de ABs en alimentos requiere la coincidencia de tres factores:

- **Presencia de bacterias productoras.** La formación de una AB determinada requiere la presencia de bacterias con la correspondiente actividad aminoacil Descarboxilasa. Para prevenir la acumulación de aminos es necesario utilizar una materia prima con buena calidad microbiológica y evitar la contaminación durante el proceso de elaboración. Además, se recomienda seleccionar cepas carentes de esta actividad para el diseño de cultivos iniciadores (Spano *et al.*, 2010).
- **Disponibilidad de aminoácidos sustrato.** La síntesis de ABs está limitada por la presencia de los aminoácidos sustrato, que a su vez se encuentra ligada cualitativa y cuantitativamente a las materias primas y al proceso fermentativo. En la fabricación de queso, la proteólisis de la caseína durante la maduración es crítica para la acumulación de ABs, ya que en este proceso se generan los aminoácidos sustrato para la reacción (Linares *et al.*, 2011).
- **Condiciones ambientales adecuadas.** El pH es considerado como uno de los factores clave en la producción de ABs. La mayoría de los enzimas con actividad descarboxilasa de aminoácidos tienen un pH óptimo en torno a 5,0. En el caso de la histidina descarboxilasa, el pH ácido induce los cambios estructurales necesarios para su actividad. Además, se ha comprobado en algunos casos que los genes que codifican las aminoacil Descarboxilasas están inducidos a pH ácido. En los alimentos fermentados, la propia fermentación hace que se alcancen las condiciones óptimas de pH para la síntesis de ABs.

Otro factor ambiental que influye en la producción de ABs es la temperatura. Así, se ha observado que existe una reducción en la formación de ABs en quesos fabricados y conservados a bajas temperaturas. Otros factores como la concentración de sales o la presencia del piridoxal-5'-fosfato (PLP), cofactor indispensable para algunas descarboxilasa, parecen tener influencia en la síntesis de ABs (Linares *et al.*, 2011).

2.3 MÉTODOS PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE ABs EN PRODUCTOS LÁCTEOS

El contenido total de las distintas ABs en los alimentos fermentados depende fuertemente de la naturaleza del producto (aminoácidos sustrato disponibles), los microorganismos presentes y las condiciones ambientales.

La disponibilidad de aminoácidos sustrato es difícil de reducir en los productos lácteos, ya que la proteólisis es esencial en la maduración de los quesos. Además, los aminoácidos intervienen en las características organolépticas de estos productos (Linares *et al.*, 2011).

El control de la temperatura ha sido descrito como una de las posibles formas de prevenir la formación de ABs, habiendo una reducción en la formación de ABs en quesos hechos a temperaturas de incubación más bajas (Linares *et al.*, 2011).

Sin embargo, la mejor forma para prevenir la acumulación de ABs es la eliminación de microorganismos con actividad aminoacil-descarboxilasa de los productos lácteos. La relación entre el contenido en ABs y el tratamiento térmico de la leche utilizada en la producción de queso ha sido ampliamente estudiada. El análisis del contenido en ABs de distintos tipos de queso mostró que estos compuestos eran más comunes en quesos fabricados con leche cruda que en aquellos fabricados con leche pasteurizada (Fernández *et al.*, 2007a), aunque se debe partir de un producto crudo con buena calidad microbiológica, ya que existen cepas productoras de ABs que pueden sobrevivir a la pasteurización (Ladero *et al.*, 2011). También es importante elegir cultivos iniciadores que no contengan cepas capaces de producir ABs. Se ha visto que algunos cultivos iniciadores poseen cepas con actividad aminoacil-descarboxilasa (Burdychova & Komprda, 2007). En definitiva, el estudio de los microorganismos productores de ABs, de los factores implicados en la expresión de los genes codificantes de las descarboxilasas y los transportadores, así como de la actividad de las proteínas

correspondientes, puede conducir a nuevas estrategias para prevenir la formación de ABs en estos alimentos.

2.4 HISTAMINA

La histamina es una de las ABs más importantes en las intoxicaciones alimentarias debido a su elevada actividad biológica (Bodmer *et al.*, 1999). Puede actuar como hormona local y como neurotransmisor, modulando una gran variedad de funciones. Su papel fisiológico incluye el control de la secreción de ácido gástrico, crecimiento y diferenciación celular, ritmo circadiano, atención y conocimiento. Además, la histamina está implicada en las reacciones alérgicas mediante la unión a receptores específicos cuyo efecto es la contracción del músculo liso, la dilatación de los vasos sanguíneos y el flujo de plasma sanguíneo a los tejidos periféricos (Jarisch, 2004; Jørgensen *et al.*, 2007; Rangachari, 1992).

Como ya explicamos anteriormente, las ABs ingeridas con los alimentos deben ser transformadas en formas menos activas antes de pasar al torrente sanguíneo. Los enzimas encargados de metabolizar la histamina son la diamino oxidasa (DAO), que cataliza la reacción de desaminación oxidativa en los enterocitos, o la histamina-N-metiltransferasa (HNMT), que cataliza una reacción de metilación de la histamina en las células hepáticas (Jarisch, 2004).

La ingesta de alimentos con elevadas cantidades de histamina o el mal funcionamiento del enzima DAO puede resultar en una intolerancia a histamina, causando numerosos síntomas. La intoxicación por histamina se caracteriza por un periodo de incubación con un rango de entre unos minutos a horas y provoca síntomas que se perciben sólo durante algunas horas. Entre los síntomas que causa aparecen efectos sobre los vasos sanguíneos y el músculo liso, e incluyen dolor de cabeza, secreción nasal, broncoplasma, taquicardia, extrasístoles, hipotensión, edema, urticaria, prurito, rubor y asma (Jarisch, 2004; Maintz & Novak, 2007). La histamina en la dieta también produce migrañas en individuos susceptibles que sufran deficiencias en la DAO (Maintz & Novak, 2007).

La intoxicación más habitual producida por histamina es la enfermedad escombroides, causada por la ingesta de pescado, normalmente de la familia *Scombridae*, que contiene altas concentraciones de esta AB (Shalaby, 1996). Sin embargo, también existen numerosos casos de intoxicación por histamina relacionadas con el consumo de queso. Algunos quesos implicados en este tipo de intoxicaciones fueron Gouda, queso Suizo, Cheddar, Gruyere y Cheshire (Shalaby, 1996). En 2006 apareció un brote de

intoxicación por histamina en España, causado por queso rallado, que fue alertado por la RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). La concentración de histamina de los quesos implicados en los brotes estaba en un rango de entre 850 y 1870 mg kg⁻¹) (EFSA, 2011).

La legislación específica sobre el contenido de ABs en alimentos es escasa. Para los productos del pescado existe límites claros en el contenido de histamina (European Union Commission (EC) n°2073/2005 y la “Food and Drug Administration” USA (FDA, 2001)), pero sólo existen recomendaciones en cuanto a los límites para otros alimentos (p. ej. 100 mg de histamina por kg de alimento, o 2 mg de histamina por litro de bebida alcohólica) (Linares *et al.*, 2011).

2.4.1 SÍNTESIS DE HISTAMINA

La síntesis de histamina se produce por la descarboxilación del aminoácido histidina gracias a la acción del enzima histidina descarboxilasa (HDC) (EC. 4.1.1.22). En la síntesis también se requiere la actuación de una proteína transportadora implicada en el intercambio histidina/histamina (Nelly *et al.*, 1996).

En la naturaleza, existen dos tipos de histidinas decarboxilasa. Unas dependen de piridoxal-5'-fosfato como cofactor y engloba a todas las histidinas decarboxilasas de bacterias Gram negativas y de células eucariotas. Las otras, dependen de la formación de un residuo piruvoil tras la autocatálisis del proenzima, a este grupo pertenecen las HDCs de bacterias Gram positivas (Linares *et al.*, 2011).

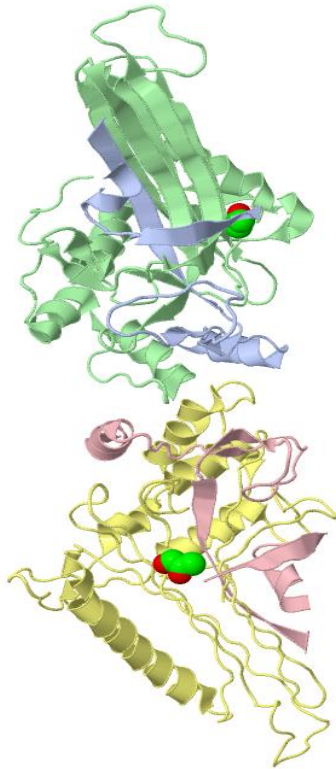


Figura 5: Estructura de la HDC dependiente de piruvato a pH 8 de *Lactobacillus saerimneri* 30a (Schelp *et al.*, 2001).

El gen que codifica la histidina descarboxilasa (*hdcA*) ha sido identificado en algunos microorganismos Gram negativos como *Photobacterium* spp., *Morganella morganii*, *Klebsiella* spp., y *Enterobacter* spp. (Takahashi *et al.*, 2003), la mayoría procedentes de pescados crudos. Sin embargo, el mayor número de genes ha sido descrito en especies de microorganismos Gram positivos, como *Lb. Saerimneri* 30a (Vanderslice *et al.*, 1986), *Clostridium perfringens* (Vanpoelje *et al.*, 1990), *O. oeni* 9204 (Coton *et al.*, 1998), *Tetragenococcus halophilus*(AB076394), *Tetragenococcus muriaticus* JCM10006^T (Konagaya *et al.*, 2002), *Lb. buchneri* B301 (Martín *et al.*, 2005), *Lb. hilgardi* 0006 (Lucas *et al.*, 2005), *Lb. reuteri* JCM1112 (AAOV000000000) y en *Lb. Sakei* LTH2076 (Coton *et al.*, 2005). En bacterias Gram positivas, excepto en *C. perfringens*, este gen aparece formando parte de un operón que incluye el gen *hdcB*.

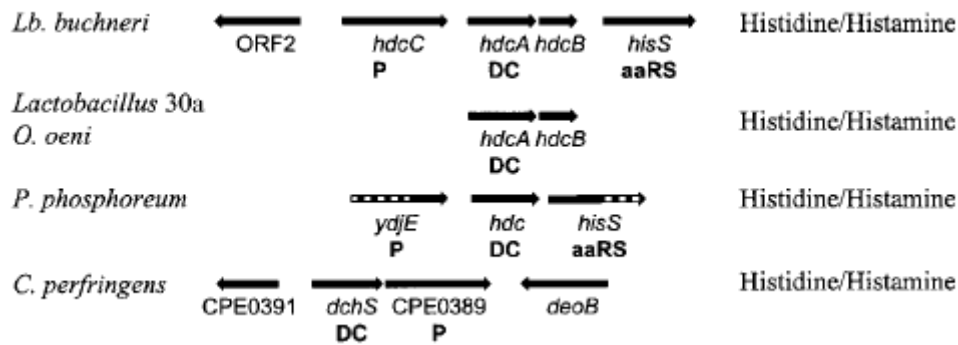


Figura 6: Comparación de la organización genética de la región histamina descarboxilasa de diferentes bacterias. *Lb. buchneri*, AJ749838; *Lactobacillus saerimneri* 30a, J02613; *O. oeni*, U58865; *Photobacterium phosphoreum*, AY223843; *C. perfringens*, NC003366.

El gen *hdcA* se transcribe dando lugar a un proenzima, formado por una cadena π inactiva, de 37 kDa. Este proenzima es activado por el enzima HdcB, que actúa como un trímero, catalizando el corte de la cadena π entre dos residuos de serina para dar lugar a la cadena α y la cadena β . La cadena α , localizada en el extremo C-terminal del proenzima, se convierte en el grupo piruvoil que actúa como grupo prostético. (Trip *et al.*, 2011).

Además, en el extremo 5' de esta agrupación génica se encuentra un tercer gen que codifica un transportador histamina/histidina (*hdcC* o *hdcP*) y en algunos casos, aparece un cuarto gen (*hisS* o *hisRS*) que codifica una proteína similar a histidil-tRNA sintetasas (Lucas *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2005).

La clonación del gen *hdcC* (o *hdcP*) de las cepas *Lb. buchneri* B301 y *Lb. hilgardii* 0006 y su posterior expresión en *Lactococcus lactis*, ha demostrado que este gen codifica proteínas de membrana de 52 y 40 kilodaltons (kDa), respectivamente (Lucas *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2005). Se ha comprobado además, que esta proteína es capaz de intercambiar histamina por histidina (Lucas *et al.*, 2005).

Los microorganismos responsables de la acumulación de histamina en quesos pueden ser tanto levaduras como bacterias. Sólo algunas cepas de *Debaryomyces hansenii* aisladas de queso son capaces de producir histamina (Gardini *et al.*, 2006) y muchas de las bacterias Gram negativas, descritas como contaminantes frecuentes de la leche, son capaces de producir histamina (Ten Brink *et al.*, 1990). Sin embargo, la mayoría de productores de ABs en quesos son bacterias Gram positivas, siendo las BAL las principales productoras de histamina. Éstas pueden proceder de la microbiota de la leche, incorporarse por contaminación o incluso formar parte de cultivos iniciadores

(Linares *et al.*, 2011). A pesar de las altas concentraciones de histamina en quesos, se desconoce cuáles son las especies bacterianas implicadas en su síntesis. Hasta la fecha la única aislada de quesos es el *L. buchneri* B301 (Joosten & Northolt, 1987). Por este motivo, y dada la importancia que tiene el conocimiento de las bacterias implicadas en la síntesis de histamina para evitar su acumulación en quesos, el objetivo de este trabajo es obtener bacterias productoras de histamina aisladas a partir de queso, identificarlas y caracterizarlas genéticamente.

3. **MATERIALES Y MÉTODOS**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MICROORGANISMOS

La cepa *Lactobacillus parabuchneri* DSM5987 se utilizó como control positivo para la actividad histidina descarboxilasa y para las reacciones de amplificación del gen *hdcA*.

El resto de cepas fueron aisladas de distintos tipos de muestra como se indica en el apartado 3.4.

3.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Todas las bacterias fueron crecidas a 37°C en anaerobiosis [10 % H₂, 10 % CO₂ y 80 % N₂] utilizando una campana Mac 500 (Don Whitley Scientific, West Yorkshire, UK). Como medios de cultivo se utilizaron MRS (OXOID) o LAPTg (Raibaud *et al.*, 1961). Cuando fue necesario, el medio se suplementó con cicloheximida 50 µg ml⁻¹ para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras. Para el enriquecimiento de cepas productoras de histamina los medios se suplementaron con histidina a una concentración final de 0,1 % (p/v) y con piridoxal-5-fosfato al 0,005%. Para analizar la capacidad de producción de histamina el medio utilizado se suplementó con histidina a una concentración final de 1% (p/v) y con piridoxal-5-fosfato al 0,005%. Los cultivos utilizados para extracción de ADN se suplementaron con glicina al 1% (p/v). Los medios sólidos se prepararon con agar al 2% (p/v).

Para el cribado de cepas productoras de ABs se utilizó el medio de descarboxilación de histidina descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999), suplementado con histidina a una concentración final de 0,1%. Este medio contiene púrpura de bromocresol, que actúa como indicador de pH, cambiando a color púrpura cuando el medio se basifica.

3.3 ANÁLISIS DE ABs POR UHPLC

Para conocer tanto la concentración de histamina en las muestras de queso como para determinar la capacidad de producción de histamina de las cepas seleccionadas se utilizó la técnica de cromatografía líquida UHPLC.

3.3.1 EXTRACCIÓN DE ABs

Para realizar este estudio se seleccionaron variedades de quesos que suelen contener altas concentraciones de histamina.

La extracción de ABs de las muestras de queso se realizó según el siguiente protocolo. Se tomó 1 g de queso y se resuspendió en 9 ml de 0,1 M HCl-0,2% TDPA y se homogeneizó durante 2 minutos a 20000 rpm utilizando un *Ultra-Turrax* (OMNI Internacional, Waterbury USA). Esta mezcla se incubó durante 30 min en un baño de ultrasonidos, tras lo cual se centrifugó durante 30 minutos a 1750 g. Tras eliminar la capa superior de grasa, 1 ml del sobrenadante fue filtrado con una membrana de 0,45 µm y posteriormente se pasó a través de unas columnas de desproteización (Amicon Biomax 5; Millipore) centrifugando a 3500 g durante 1 hora. (Ladero *et al.*, 2008).

Para determinar la capacidad productora de histamina de los microorganismos aislados se centrifugaron 10 ml de un cultivo *overnight* (o/n) a 3000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se utilizó como muestra para el análisis mediante UHPLC.

3.3.2 DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron derivatizadas con dietiletoximetilen malonato (DEEMM) (Sigma Aldrich) siguiendo una adaptación del método descrito por Gómez-Alonso *et al.* (2007). En este protocolo se mezclaron 100 µl del extracto de queso o del sobrenadante del cultivo celular, 175 µl de bufer borato 1M (ácido bórico 1M neutralizado con NaOH hasta alcanzar pH 9,0), 75 µl de metanol, 2 µl de ácido L-2-aminoadipico (estándar interno) (2 g/l) y 3 µl de DEEMM. Esta mezcla fue incubada a 30°C en un baño de ultrasonidos durante 45 minutos y después fue calentada a 70°C durante 2 h para conseguir la degradación completa del exceso de DEEMM y productos secundarios. Estas muestras se filtraron con una membrana de 0,22 µm acoplada a una aguja (VWR) en un vial cónico (Waters, Milford, MA, USA). Cuando la dilución fue necesaria ésta se hizo utilizando HCl 0,1 N como disolvente.

3.3.3 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS MUESTRAS

La separación cromatográfica de las muestras se llevó a cabo utilizando el cromatógrafo *H-Class Acquity UPLC™ system* (Waters, Milford, MA, USA) y una columna *Waters Acquity UPLC™ BEH C18 1,7 µm* (2,1 mm x 200 mm). La detección tuvo lugar a 280 nm y los datos fueron analizados con el software *Empower version 2* (Waters).

3.4 AISLAMIENTO DE CEPAS

Las muestras de queso fueron homogeneizadas en un *Stomacher Lab-Blender 400* (Seward Medical, Londres, UK), para lo cual se diluyó 1 g de queso en 9 ml de medio

de cultivo. En el caso de las muestras de queso Cabrales y Zamorano el medio utilizado fue MRS mientras que para el queso Emmental y el Gamoneu se utilizó LAPTg. En ambos casos se añadió cicloheximida al medio para evitar la proliferación de hongos.

Para los cultivos de enriquecimiento, estos homogeneizados fueron incubados o/n en medio suplementado con histamina al 0,1%, a 37°C en anaerobiosis, tras lo cual se hizo una dilución 1/10 de estos cultivos en el mismo medio fresco. Estos cultivos se incubaron o/n y la operación se repitió dos veces. A partir de los cultivos enriquecidos se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en placas de MRS o LAPTg con agar, suplementados con histidina al 0,1% (p/v) y con piridoxal-5-fosfato con el fin de obtener colonias aisladas. En este caso también se añadió cicloheximida al medio.

En los casos en los que no se realizó una fase de enriquecimiento, los homogeneizados se hicieron en medio no suplementado y se dejaron a temperatura ambiente 30 minutos aproximadamente, tras lo cual se hicieron diluciones seriadas de los mismos y a continuación se sembraron en placas de MRS o LAPTg con agar, suplementadas con cicloheximida.

3.5 SELECCIÓN DE CEPAS

3.5.1 SELECCIÓN EN MEDIO DE DESCARBOXILACIÓN DE HISTIDINA

Las cepas aisladas en placa se cultivaron en medio de descarboxilación de histidina (descrito en el apartado 3.2) en placas microtiter durante 24-72 horas a 37°C y en anaerobiosis. Las cepas que produjeron viraje a color púrpura en el medio, debido a la alcalinización del mismo, fueron seleccionadas.

3.5.2 COMPROBACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA

La capacidad de producción de histamina de los aislados seleccionados en medio de descarboxilación fue analizada mediante dos técnicas cromatográficas: TLC y UHPLC.

3.5.2.1 Cromatografía en capa fina

En primer lugar, la capacidad de producción de histamina fue analizada mediante cromatografía en capa fina (TLC, *Thin-Layer Chromatography*). Para la preparación de las muestras, los aislados se crecieron en MRS o LAPTg suplementado con histamina al 1%. El sobrenadante obtenido por centrifugación del cultivo a 1800 g durante 10 min fue filtrado utilizando un filtro de 0,2 µm *Supor* (Pall, USA).

Como reactivo de derivatización se utilizó cloruro de dansilo (Sigma). Se preparó una solución de 5 g l⁻¹ en acetona (Merck) inmediatamente antes de la reacción, se filtró a través de un filtro 0,2 µm Supor (Pall) y se mantuvo en oscuridad.

La derivatización de las muestras, es decir, la conversión de las ABs en sus derivados fluorescentes se realizó mediante la siguiente mezcla de reacción:

- 5 µl de muestra
- 10 µl Na₂HPO₄ 1M (pH 9 a 37°C)
- 0,5 µl NaOH 4N
- 10 µl de la solución de cloruro de dansio

La mezcla de reacción se incubó en oscuridad en un baño a 55°C durante 1 h.

Los productos derivatizados fueron separados en placas de TLC de cristal de 20 por 20 cm recubiertas con 0,20 mm de gel de sílice 60 (Merck). 8 µl de cada muestra derivatizada se cargaron en la placa de TLC a 1,5 cm de la base y con una separación de al menos 1 cm entre cada muestra. Las muestras se separaron utilizando cloroformo-trimetilamina (Sigma) (4:1) como eluyente. La visualización de los compuestos derivatizados se realizó mediante excitación con luz UV utilizando el equipo Image Quant 350 (GE Healthcare). Las imágenes fueron capturadas utilizando la cámara acoplada a este equipo y posteriormente se analizaron con el programa IQuant Capture 350.

3.5.2.2. UHPLC

Para asegurar que se estaba trabajando con cultivos puros, antes de confirmar mediante UHPLC la capacidad de producción de histamina de los aislados, se procedió a su re-aislamiento. Las cepas reaisladas se cultivaron o/n a 37°C y en anaerobiosis, en medio MRS o LAPTg suplementados con histidina 10 mM. Las células se sedimentaron por centrifugación y se analizó la presencia de histamina en el sobrenadante mediante UHPLC mediante el protocolo indicado anteriormente (apartado 3.3).

3.6 MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN

3.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE QUESOS

La presencia de cepas productoras de histamina en las muestras de queso fue analizada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Previamente se realizó la extracción de ADN de los quesos. Para ello, 5 g de queso fueron homogeneizados mecánicamente en 40 ml de citrato sódico al 2% (p/v) utilizando un *Stomacher* Lab-Blender 400

(Seward Medical, Londres, UK) durante un minuto. El ADN total se extrajo del homogeneizado siguiendo el método de Ogier *et al.* (2002) ligeramente modificado (Fernández *et al.*, 2006; Ladero *et al.*, 2008)

3.6.2 EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO

Para la extracción de ADN total de las distintas cepas se partió de 1,5 ml de un cultivo o/n. Las cepas se crecieron en medio MRS o LAPTg suplementado con treonina 40 mM. Las células se recolectaron mediante centrifugación y tras ser lavadas en una solución TE (EDTA 1mM, Tris-HCl 10 mM, sacarosa 0.3 M; pH 8.0), se resuspendieron en 200 µl de la solución I de *Lactococcus* (sacarosa 20%, EDTA 10mM, Tris-HCl 10mM, NaCl 50mM; pH 8.0) con lisozima (30 mg ml⁻¹) y mutanolisina (150U). A continuación se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Finalmente se aisló el ADN utilizando el kit comercial *GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *iCycler™ thermalcycler* (Bio-Rad, USA). Para la amplificación del ADNr 16S se utilizó el enzima *Taq DNA Polymerase 5PRIME* (Eppendorf, USA) y para el resto de amplificaciones el enzima *DreamTaq™ DNA Polymerase* (Fermentas), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los cebadores utilizados fueron sintetizados por Sigma Genosys, UK.

El programa de amplificación se inició con una desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificación cada uno de los cuales consistió en 30 s a 94°C, 30 s a la correspondiente temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos. El periodo de elongación del ADNr 16S fue de 1 min y 30 s a 68°C seguido de un período final de extensión de 7 min a 68°C. Para el resto amplificaciones el periodo de extensión fue de 1 min por cada kbase amplificada a 72°C. Las temperaturas de anillamiento empleadas fueron entre 5 y 10°C inferiores a las temperaturas de fusión (T_m) teóricas de los oligonucleótidos, calculadas por el proveedor comercial.

A continuación se muestra una tabla con los oligonucleótidos utilizados.

Nombre oligonucleótido	Función	Fuente	Secuencia
hdc1	qPCR hdcA	Fernández <i>et al.</i> , 2006	5'- TTGACCGTATCTCAGTGAGTCCAT- 3'
hdc2	qPCR hdcA	Fernández <i>et al.</i> , 2006	5'- ACGGTCATACGAAACAATACCATC- 3'
27F	Amplificación 16S rADN	Lane <i>et al.</i> , 2001	5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'
1492R	Amplificación 16S rADN	Turner <i>et al.</i> , 1999	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3'
hdc3	Amplificación hdcA	Coton & Coton, 2005	5'-GATGGTATTGTTTCKTATGA-3'
hdc4	Amplificación hdcA	Coton & Coton, 2005	5'-CAAACACCAGCATCTTC-3'

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo, su función, la fuente y la secuencia.

Los productos de amplificación por PCR se purificaron utilizando el kit *ATP™ Gel/PCR Extraction* siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.4 VISUALIZACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 0,8 % (p/v). Como electrolito se empleó el tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8). Antes de cargar las muestras en el gel, se añadieron 2 µl de tampón de carga densificante 10X (Takara, Japón). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V. El ADN se visualizó por exposición a la luz UV en un equipo *Gel Doc 2000* (Bio-Rad, USA) tras su tinción en una solución de bromuro de etidio (1 µg ml⁻¹) en agua. Como patrón de peso molecular se utilizó el *Gene Ruler™ DNA ladder mix* (Fermentas, Lituania).

3.6.5 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)

La qPCR se realizó utilizando el kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Warrington, UK) con los oligonucleótidos *hdc1* y *hdc2* descritos por Fernández *et al.* (2006), los cuales están específicamente diseñados para la detección del gen de la histamina descarboxilasa de las BAL (*hdcA*). La reacción se realizó en un volumen total de 20 µl que incluyen 1 µl de ADN molde, 10 µl de *SYBR Green PCR Master Mix* (que contiene ROX como referencia pasiva) y 900 nM de cada oligonucleótido. La amplificación y la detección se llevaron a cabo utilizando un *ABI Prism Fast 7500 sequence detection system* (Applied Biosystems) siguiendo las siguientes condiciones: 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 58°C. El número del ciclo al cual la señal de la fluorescencia cruzó el ciclo umbral elegido (Ct; en este caso el establecido por defecto por el fabricante) fue anotado (Fernández *et al.*, 2006; Ladero *et al.*, 2008).

A partir del valor de Ct se pudo estimar el número de unidades formadoras de colonia (ufc) que poseen el gen *hdcA* por cada gramo de queso mediante la fórmula (Fernández *et al.*, 2006):

$$\text{Ufc/reacción} = (\text{Ct} - 29,139) / (-3,5603)$$

$$\text{Ufc g}^{-1} \text{ queso} = \text{ufc/reacción} \times 300$$

3.6.6 SECUENCIACIÓN DE ADN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Las muestras de ADN fueron secuenciadas por la empresa MacroGen (Korea). Las secuencias fueron leídas con el programa CHROMAS (Version 1.45). La búsqueda de similitudes de las secuencias obtenidas con las presentes en las bases de datos se realizó utilizando el programa BLAST® (Altschul *et al.*, 1997). Los alineamientos de las secuencias se realizaron mediante el programa CLUSTALW (Larkin *et al.*, online, 2007).

3.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSANTE (PFGE)

Este método analiza el polimorfismo del ADN mediante el estudio de los fragmentos de restricción del genoma bacteriano, generados con una endonucleasa de baja frecuencia de corte (*NotI*), y su posterior separación electroforética en campo pulsante. El protocolo comprende las siguientes etapas:

3.7.1 CULTIVO

Los microorganismos aislados de quesos y que fueron seleccionados por su capacidad de producción de histamina fueron crecidos o/n en estático en MRS suplementado con glicina al 1% (p/v). Las células de 1,5 ml de este cultivo fueron recolectadas por centrifugación (8000xg, 10 min) y lavadas dos veces con 0,5 ml de buffer STE-100 (Tris-HCl 100mM, EDTA 100 mM, sacarosa 0,3 mM). Seguidamente estas células fueron congeladas para favorecer su posterior ruptura.

3.7.2 PREPARACIÓN DE LOS BLOQUES

Se trata de un paso clave en esta técnica puesto que el ADN debe mantenerse intacto. Una vez descongeladas las células fueron resuspendidas en 500 μ l de buffer STE-100 con 1 μ l mutanolisina (150 U μ l⁻¹) (Sigma). La suspensión bacteriana fue incubada durante 30 min a 37°C y un volumen de 200 μ l de la misma se mezcló con 240 μ l de agarosa líquida de bajo punto de fusión al 1,8 % (p/v) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) a 40°C. Alícuotas de 200 μ l de esta mezcla se pipetearon en moldes y se dejó que solidificasen a 4°C. Los bloques de agarosa se sacaron del molde y se incubaron en 2 ml de una disolución de lisis (Tris-HCl 6 mM a pH 8,1, NaCl 1M, EDTA 100 mM, N-lauroilsarcosina al 0,5% p/v (Merk), ácido desoxicólico al 0,2% p/v (Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania), Brij 58 al 0,5% p/v (Merk) y 2 mg ml⁻¹ de lisozima (Sigma)) durante 2 h a 37°C. Tras este periodo, los bloques de agarosa se transfirieron al buffer ESP (EDTA 0,5 M, N-laurosilsarcosina al 0,5% p/v, 1 mg ml⁻¹ de proteinasa K) (Roche, Basel, Suiza) y se incubaron o/n a 55°C. El empleo de estos agentes garantiza la lisis celular, así como la eliminación de las proteínas, evitando el daño que algunas podrían causar al ADN.

3.7.3 LAVADO DE LOS BLOQUES

Tras eliminar el buffer ESP se realizan un total de 6 lavados a 50°C durante 15 minutos, el primero con TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Roche), al que le siguen cinco con TE. La pureza de la agarosa de los bloques permite el paso de las soluciones a su través, consiguiendo un ADN purificado y evitando la fragmentación del mismo. En este punto, los bloques se pueden conservar a 4°C en TE hasta su utilización, siempre que se vayan a utilizar en el plazo de un mes, o en EDTA 0,5 M si se quieren guardar más tiempo.

3.7.4 REACCIÓN DE RESTRICCIÓN

La digestión del ADN contenido en los bloques se realizó a 37°C durante 4 horas utilizando 20U de los enzimas de restricción *NotI* (5'- GCGGCCGC -3') y *ApaI* (5'- GGGCCC -3') (Takara Bio Inc).

3.7.5 ELECTROFORESIS

Tras detener la digestión los bloques se colocaron en un peine y se introdujeron en agarosa al 1% con TBE 0,5x (tris-Borato 45mM pH8-EDTA 1mM). La electroforesis se llevó a cabo en el aparato CHEF-DR III (Bio-Rad) a 14°C con un campo de 4,5V cm⁻¹, empleando rampas de pulso de 0,5 a 25 s durante 12h y 25 a 50 s durante 6 h. Como control de peso molecular se utilizó λ Ladder y low range PFG marker (New England Biolabs). El ADN fue visualizado tras teñir el gel con bromuro de etidio.

Los plásmidos fueron extraídos y analizados según el método S1-PFGE descrito por Barton *et al.* (1995).

4. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las últimas décadas, la seguridad alimentaria se ha convertido en una de las preocupaciones de los consumidores en los países desarrollados, ya que afecta de forma directa a la salud de los mismos. Uno de los problemas que puede afectar a los alimentos y que los consumidores desean evitar es la aparición de sustancias tóxicas, como son las ABs. Estas se forman como resultado del metabolismo de algunos microorganismos, entre los que se encuentran las BAL, por lo que pueden aparecer en alimentos fermentados. Entre los alimentos fermentados, los productos lácteos son susceptibles de acumular grandes cantidades de ABs, especialmente los quesos.

La histamina es una de las ABs con mayor importancia debido a que su elevada actividad biológica, unida a las altas concentraciones que puede alcanzar en determinados alimentos causa efectos negativos sobre la salud de los consumidores. La aparición de histamina en el queso está afectada por diferentes factores, como son la disponibilidad del aminoácido sustrato (histidina), la presencia de microorganismos con actividad histidina descarboxilasa y las condiciones ambientales. La disponibilidad de histidina es difícil de controlar, ya que ésta se genera durante la proteólisis, un proceso esencial para la maduración del queso y para el desarrollo de las cualidades organolépticas (Fernández & Zúñiga, 2006). Una forma de prevenir la aparición de histamina, y de ABs en general, en el queso es la pasteurización de la leche, ya que de esta forma se reduce el número de microorganismos con actividades aminoacil Descarboxilasa y así se evita la acumulación de ABs (Ladero et al., 2010b; Linares *et al.*, 2011). Aun así, los cultivos iniciadores pueden contener cepas con capacidad de producir estos compuestos (Burdychova & Komprda, 2007), por lo que es importante que los microorganismos seleccionados para este fin no tengan la capacidad de producir histamina. Además, se ha demostrado que algunas cepas productoras de ABs son resistentes a la pasteurización (Ladero *et al.*, 2010b). Es por todo ello evidente, que para poder solucionar el problema que supone la presencia de ABs en los alimentos es necesario conocer y caracterizar los microorganismos responsables de su síntesis.

El presente trabajo se ha centrado en la identificación de las bacterias responsables de la biosíntesis de histamina en quesos; para ello, se han analizado 17 quesos con un periodo de maduración superior a dos meses, adquiridos al azar en distintos supermercados. El periodo de maduración debía ser largo, ya que éste tiene gran influencia en la formación

de ABs (Novella-Rodríguez *et al.*, 2004; Pinho *et al.*, 2004; Komprda *et al.*, 2004). De estas muestras se han seleccionado las 4 que presentaban las concentraciones de histamina más altas y a partir de ellas se realizó el aislamiento de microorganismos capaces de sintetizar esta AB. Las bacterias obtenidas se han caracterizado genótipicamente mediante secuenciación del ADNr 16S, macrorrestricción-PFGE y secuenciación del gen *hdcA*.

4.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS

Como ya se ha indicado anteriormente, el objetivo del presente proyecto es la búsqueda de microorganismos productores de histamina a partir de muestras de quesos. El primer punto a resolver sería determinar qué tipo de quesos deberíamos de analizar para conseguir su aislamiento. Es esperable que quesos con elevada concentración de dicha AB podrían contener un mayor número de microorganismos productores. Por ello, la selección de los quesos se hizo en base a la presencia de histamina en las muestras, lo que se determinó de forma directa mediante técnicas cromatográficas de UHPLC. La presencia de microorganismos productores se determinó mediante el rastreo del gen *hdcA* empleando técnicas de qPCR, tal y como se explica en el apartado 3.6.2.

En la figura 7 se muestra como ejemplo el cromatograma obtenido mediante UHPLC a partir del queso Cabrales E.

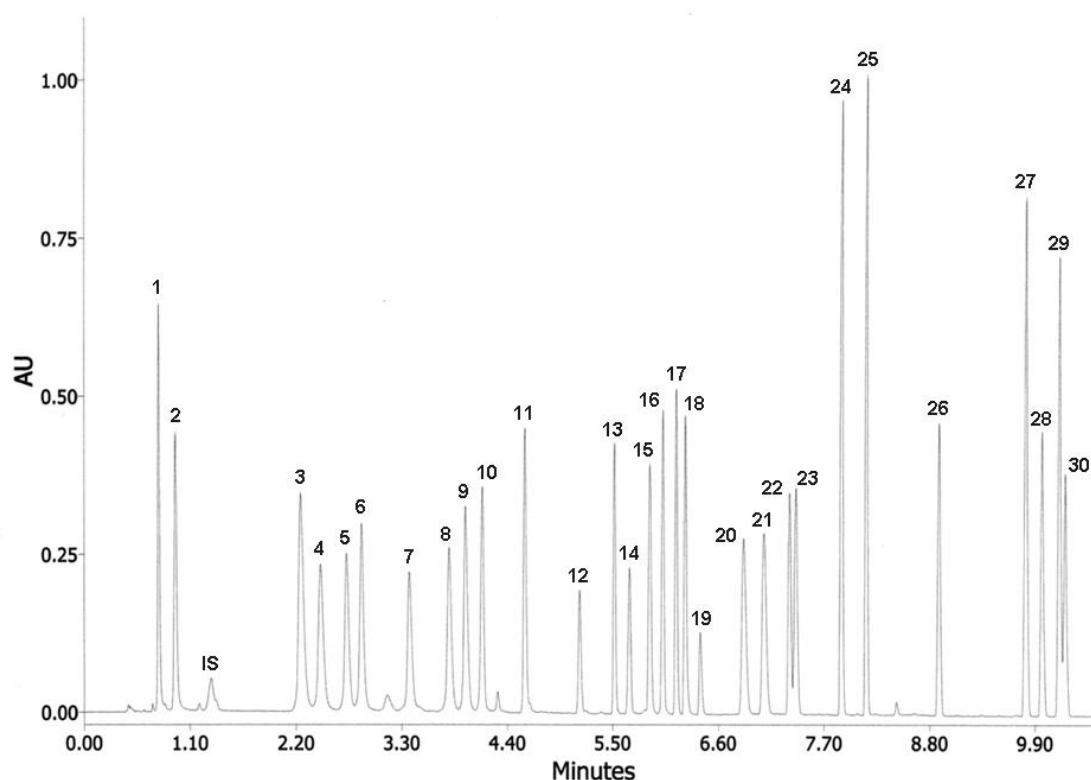


Figura 7: Cromatograma obtenido mediante UHPLC de la muestra de queso Cabrales E. 1, ácido aspártico; 2, ácido glutámico; IS, estándar interno (ácido L-2-aminoadípico); 3, asparragina; 4, serina; 5, glutamina; 6, histidina; 7, glicina; 8, alanina; 9, treonina; 10, arginina; 11, GABA; 12, prolina; 13, tirosina; 14, ión amonio; 15, agmatina; 16, histamina; 17, valina; 18, metionina; 19, cisteína; 20, triptofano; 21, isoleucina; 22, leucina; 23, fenilalanina; 24, ornitina; 25, lisina; 26, tiramina; 27, putrescina; 28, triptamina; 29, cadaverina y 30, feniletilamina.

En la tabla 2 se muestran los quesos analizados, la concentración de histamina determinada mediante UHPLC y la estimación de los microorganismos que poseen el gen *hdcA* presentes en cada gramo de muestra.

QUESOS	[HISTAMINA] (mg kg ⁻¹)	Ct	Ufc g ⁻¹ queso
Cabrales E	4.538,2	24,46	6,39x10 ³
Cabrales MD	763,8	21,13	5,50x10 ⁴
Cabrales 1	1.767,0	19,92	1,20x10 ⁵
Cabrales 2	727,0	UD	UD

Cabrales 3	1.334,5	25,89	$2,53 \times 10^3$
Cabrales 4	276,0	24,15	$7,81 \times 10^3$
Cabrales 5	128,5	28,91	$3,59 \times 10^2$
Cabrales 6	2.107,6	23,50	$1,19 \times 10^4$
Emmental 1	416,1	UD	UD
Emmental 2	156,5	35,80	4,17
La Peral 1	46,0	33,58	17,54
La Peral 2	184,1	24,39	$6,69 \times 10^3$
Gamoneu 1	3.602,2	25,91	$2,50 \times 10^3$
Gamoneu 2	469,3	33,88	14,45
Zamorano	1.113,6	23,62	$1,10 \times 10^4$
Flor de Esgueva	202,4	35,80	4,17
Boffard	230,1	33,58	17,54

Tabla 2: Concentración de histamina (mg kg^{-1}) y estimación de las ufc g^{-1} de queso productoras de histamina en las muestras de queso. Se han marcado en gris los quesos seleccionados para el cribado. UD= No detectado.

En este análisis se esperaba una relación directa entre el número de ufc productoras de histamina por g de queso y la concentración de histamina en las muestras (Fernández *et al.*, 2006). Sin embargo, es de resaltar, que algunas muestras se desvían de los valores esperados. Por ejemplo, el queso Cabrales MD tiene una concentración de histamina de $763,8 \text{ mg kg}^{-1}$ y el queso Cabrales 6 tiene una concentración de $2.107,6 \text{ mg kg}^{-1}$. En contra de lo esperado, en el primero se han estimado $5,50 \times 10^4$ ufc productoras de histamina por gramo de queso mientras que en el segundo sólo se han estimado $1,19 \times 10^4$. Otro ejemplo discordante lo tenemos en el queso Cabrales E que presenta una concentración de histamina de $4.538,25 \text{ mg kg}^{-1}$ pero solamente se predicen $6,39 \times 10^3$ ufc g^{-1} . Estos datos confirman que, aunque la presencia de microorganismos productores de ABs es imprescindible para que estas se acumulen en alimentos, las concentraciones finales alcanzadas dependen de otros factores ya indicados previamente, como la presencia del aminoácido sustrato o las condiciones ambientales. La existencia de quesos con histamina en los que no se detectó la presencia de microorganismos productores parece indicar la existencia de cepas que no serían detectadas por el método

de qPCR, posiblemente debido a mutaciones en las regiones del gen *hdcA* en las que se diseñaron los oligonucleótidos cebadores.

Los quesos elegidos se han marcado en la tabla en color gris. Se ha tenido en cuenta, por un lado, que la concentración de histamina fuera elevada, y por otro, que los valores obtenidos por qPCR indicaran la presencia de altos números de microorganismos con capacidad de descarboxilar la histidina. La selección de muestras también se ha realizado de forma que los quesos tuviesen distintos orígenes.

4.2 AISLAMIENTO DE CEPAS PRODUCTORAS DE HISTAMINA

Algunos autores apoyan la teoría de que la capacidad de producción de ABs confiere a las bacterias una ventaja en condiciones de estrés ácido, debido a que la descarboxilación de un aminoácido consume un protón del medio y genera una amina y una molécula de CO₂, ayudando al restablecimiento del pH externo (Silla Santos, 1996; Schelp *et al.*, 2001; van de Guchte *et al.*, 2002). Además, podría proporcionar una vía de obtención de energía ya que el antiporte aminoácido/amina puede generar una fuerza protón motriz (Vido *et al.*, 2004). Por este motivo, se decidió realizar una fase de enriquecimiento en medio suplementado con histidina al 0,1%. El propósito era favorecer el crecimiento de las bacterias productoras de histamina. Las muestras sometidas a enriquecimiento fueron los quesos Cabrales E, Gamoneu 1 y Emmental 1, como se indica en la tabla 2. Una muestra del queso Emmental 1 fue procesada de forma paralela, sin el paso de enriquecimiento, con el propósito de determinar si este paso era necesario a la hora de aislar los microorganismos de nuestro interés. El aislamiento de cepas de la muestra Cabrales MD también se realizó sin el paso de enriquecimiento, según lo explicado en el apartado 3.4.

En ambos casos, con el fin de obtener microorganismos aislados, se hicieron diluciones seriadas de los cultivos en medio líquido; posteriormente se sembraron en medio sólido mediante siembra por extensión; seguidamente, las colonias aisladas fueron sometidas al escrutinio en el medio de descarboxilación de histidina como se indica a continuación.

4.2.1 SELECCIÓN EN MEDIO DE DESCARBOXILACIÓN DE HISTIDINA

La selección de cepas productoras de histamina se hizo en el medio de descarboxilación de histidina, descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999). La capacidad de este medio para discriminar entre bacterias productoras de histamina y bacterias no productoras se

basa en el viraje de color del medio, debido al indicador de pH púrpura de bromocresol que contiene el medio. Este indicador cambia de color amarillo a color púrpura cuando el pH se encuentra por encima de 6,8. Los microorganismos que lleven a cabo la reacción de descarboxilación del aminoácido histidina consumirán protones presentes en el medio, por lo que el pH aumentará su valor y se producirá un cambio a color púrpura. Sin embargo, este cambio en el pH puede estar contrarrestado por la generación de ácido durante la fermentación láctica de las BAL. Por este motivo, la concentración de glucosa de este medio fue de sólo 0,005%.

La selección en medio de descarboxilación de histidina se realizó en placas de microtiter en las que cada pocillo fue inoculado con un aislado diferente. En uno de los pocillos se incluyó como control positivo la cepa de *L. parabuchneri* DSM5987. En la figura 8 se muestra un ejemplo del viraje de color del medio dependiendo de que se haya inoculado con un microorganismo productor de histamina o con uno no productor.

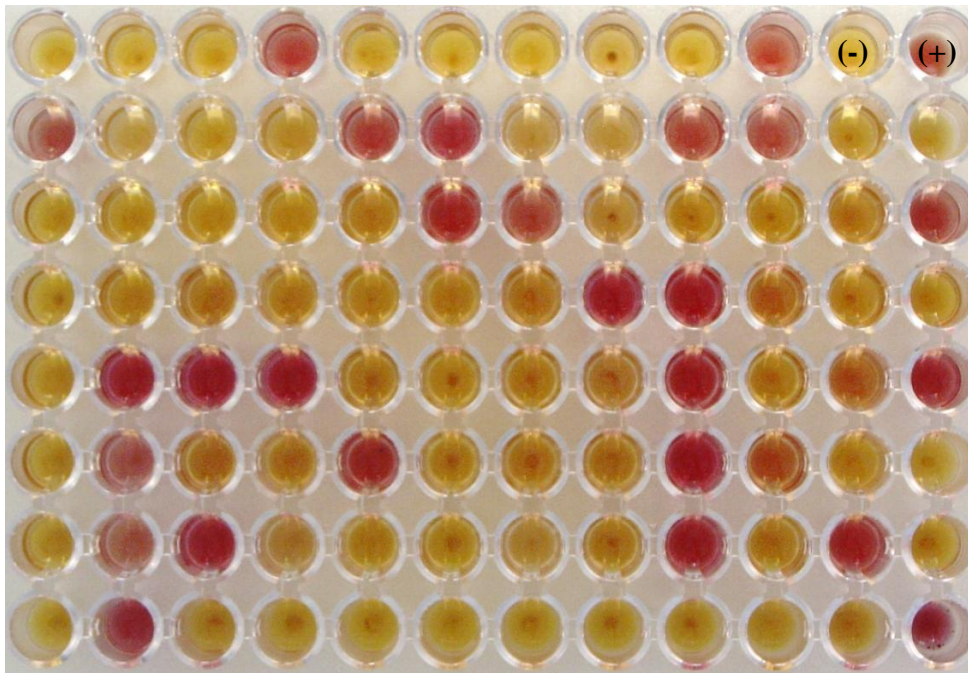


Figura 8: Cultivos en medio de descarboxilación de cepas productoras y no productoras de histamina. Las cepas capaces de producir histamina producen viraje de color en el medio de color amarillo a color violeta. (+): Control positivo (*L. parabuchneri* DSM5987). (-): Control negativo: medio suplementado con histidina.

En la tabla 3 se muestra el número de aislados obtenidos de cada queso y el número de ellos que fueron positivos en el medio de descarboxilación de histidina.

QUESO	FASE DE ENRIQUECIMIENTO	Nº AISLADOS	Nº POSITIVOS
Cabrales E	Sí	960	221
Gamoneu 1	Sí	368	0
Emmental 1	Sí	276	53
Emmental 1	No	94	25
Cabrales MD	No	212	0

Tabla 3: Resultado del cribado de aislados productores de histamina en medio de descarboxilación de histidina.

Entre los quesos en los que se obtuvieron cepas productoras de histamina existe gran variación. En el queso Cabrales E, un 23% de los aislados produjeron viraje de color. En el queso Gamoneu 1 ninguno de los aislados produjo viraje de color. En el queso Emmental 1, realizando una fase de enriquecimiento, un 19,2% de los aislados dio resultado positivo, mientras que sin la fase de enriquecimiento el resultado fue del 26,6%. En este caso, la fase de enriquecimiento no dio el resultado esperado, ya que no se aumentó la proporción de bacterias productoras de histamina en el cultivo. Este dato nos indica que las condiciones de cultivo utilizadas no suponen una ventaja selectiva para las bacterias con capacidad de producción de histamina. Por este motivo, en el cribado de las siguientes muestras no se realizó fase de enriquecimiento. Es importante destacar que en esta muestra, a pesar de no haberse detectado bacterias con el gen *hdcA* mediante qPCR, si que se aislaron bacterias productoras de histamina. El estudio posterior de estas cepas y de los genes responsables de la síntesis de histamina permitirá en un futuro mejorar el método de qPCR, de forma que también permita su detección. Como se observa en los resultados, no se obtuvieron aislados productores de histamina en todos los quesos seleccionados, aunque todos ellos tenían una alta concentración de histamina. Esto podría deberse principalmente a que las cepas productoras de histamina se encuentran en baja proporción dentro de la microbiota total del queso. También podría ocurrir que las cepas productoras hayan descarboxilado la histidina durante la maduración del queso, pero encontrarse muertas en el momento del aislamiento.

4.3 CARACTERIZACION FENOTÍPICA: PRODUCCIÓN DE HISTAMINA

Una vez llevado a cabo el aislamiento de BAL productoras de histamina en el medio diferencial se procedió a su caracterización fenotípica. En primer lugar, nos interesaba confirmar su capacidad para sintetizar histamina, empleándose para ello dos técnicas cromatográficas: TLC y UHPLC.

4.3.1. DETECCIÓN DE HISTAMINA MEDIANTE TÉCNICAS DE TLC

Tras el escrutinio de los aislados en medio de descarboxilación, los resultados positivos se confirmaron mediante técnicas cromatográficas en capa fina (TLC). Esta técnica constituye un método sencillo y barato para el análisis cualitativo de la capacidad de los microorganismos de producir histamina.

Los aislados que dieron un resultado positivo en el medio de descarboxilación fueron incubados en medio suplementado con histidina al 1%. El sobrenadante de estos cultivos fue analizado mediante TLC, tal y como se explica en el apartado 3.5.2, con el fin de confirmar que el viraje de color era debido a la transformación de histidina en histamina. En las figuras 9 y 10 se muestran dos de los cromatogramas como ejemplo. En estas imágenes se observan varias bandas fluorescentes, debido a que las cepas fueron crecidas en un medio de cultivo rico y el agente derivatizante se une a cualquier residuo de amonio presente en el mismo, así como a los metabolitos secretados por los microorganismos durante su crecimiento. Con el fin de identificar la banda correspondiente a la histamina, se incluyó como patrón una solución 1 g/l de histamina en agua (H). Además, para comprobar que la banda observada no correspondía a ningún componente del medio se incluyó un control negativo (-) consistente en medio de cultivo suplementado con histidina.

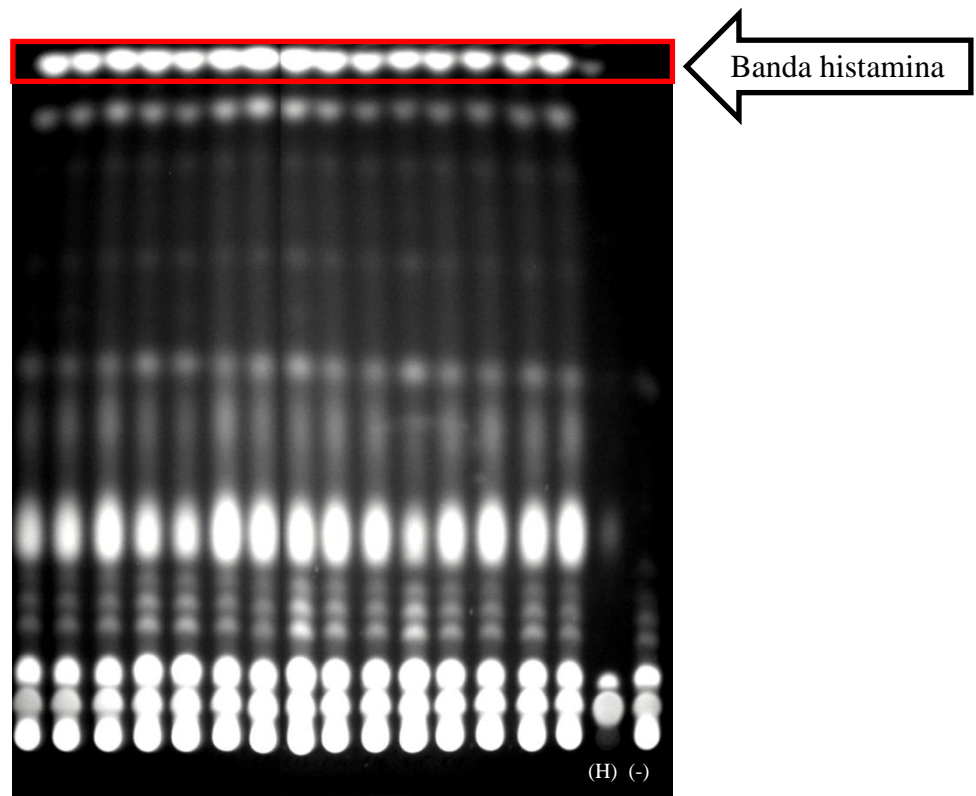


Figura 9: Cromatograma obtenido mediante análisis por TLC de los sobrenadantes de los aislados del queso Emmental 1, crecidos en medio suplementado con histidina. (H): Patrón de histamina 1 g/l. (-): Medio suplementado con histidina.

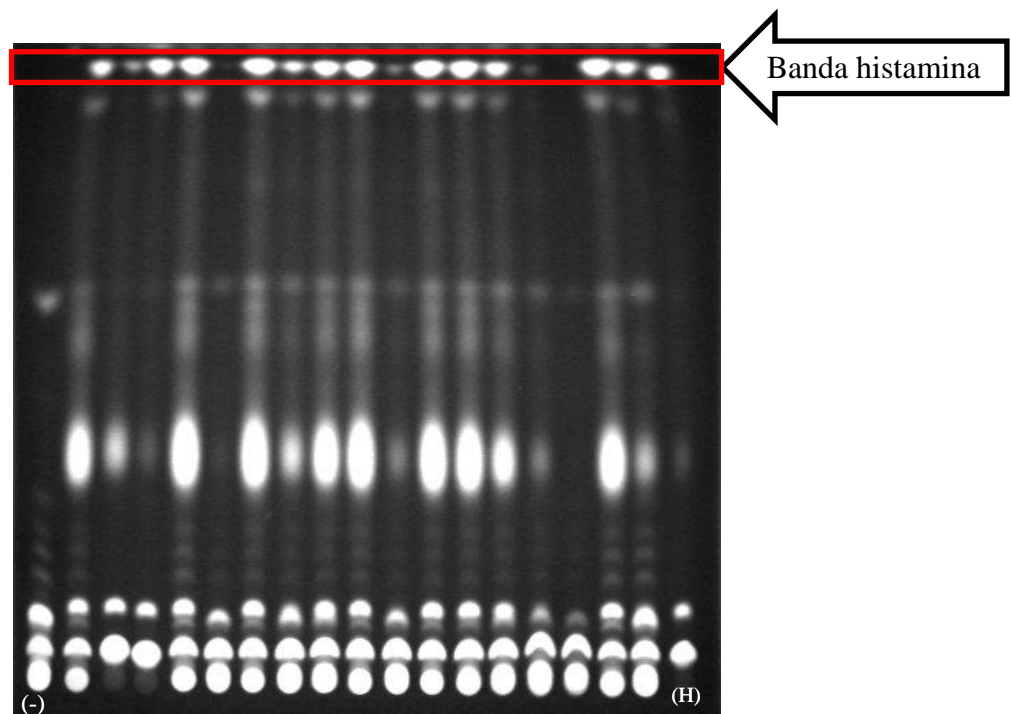


Figura 10: Cromatograma obtenido mediante análisis por TLC de los sobrenadantes de los aislados del queso Cabrales E, crecidos en medio suplementado con histidina. (H): Patrón de histamina 1 g/l. (-): Medio suplementado con histidina.

De los 221 aislados procedentes del queso Cabrales E, que produjeron viraje de color en el medio de descarboxilación, 167 dieron resultado positivo en el análisis mediante TLC.

De los 78 aislados procedentes del queso Emmental 1 (tanto del cultivo con enriquecimiento, como del cultivo sin enriquecimiento), todos dieron resultado positivo en el análisis mediante TLC.

4.3.2. DETECCIÓN DE HISTAMINA MEDIANTE UHPLC

Inicialmente se realizó el análisis mediante TLC porque el número de aislados que se debían analizar era muy elevado y la técnica UHPLC es más costosa que la técnica de TLC. Las cepas que dieron resultado positivo en el análisis mediante TLC fueron reaisladas, ya que al proceder de muestras microbiológicamente muy complejas y ante la posibilidad de contaminación cruzada en la propia placa de micrititer, algunas de ellas podrían no encontrarse en cultivo puro. Una vez reaisladas, se cultivaron en medio suplementado con histidina 10 mM y el sobrenadante fue analizado por UHPLC. De los 167 aislados del queso Cabrales E que dieron resultado positivo en el análisis por TLC, sólo 68 reaislados resultaron ser productores de histamina según el análisis mediante UHPLC. De los 78 aislados del queso Emmental 1, 64 resultaron ser productores de histamina según el análisis mediante UHPLC.

Como se puede observar, existen casos en los que el análisis mediante TLC y UHPLC no es concordante. Los casos positivos por TLC y negativos por UHPLC podrían deberse a contaminaciones cruzadas entre los distintos aislados, lo que fue posteriormente solventado mediante el reaislamiento.

4.4 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CEPAS PRODUCTORAS DE HISTAMINA

El objetivo de este trabajo es el estudio de los microorganismos responsables de la producción de histamina en quesos. Por este motivo se ha realizado una caracterización genética de todos los aislados seleccionados por su capacidad de producir histamina, de forma que puedan ser clasificados en un análisis más profundo. Inicialmente se identificó la especie a la que pertenece cada uno mediante secuenciación del ADNr 16S, para posteriormente clasificarlos según el perfil obtenido tras la macrorrestricción del ADN cromosómico con enzimas con pocas dianas de reconocimiento en el genoma y

posterior separación por electroforesis en campo de pulso (PFGE). Además, un microorganismo representante de cada perfil obtenido por PFGE fue seleccionado con el fin de proceder a la secuenciación de un fragmento interno del gen *hdcA* tras su amplificación por técnicas de PCR. Las secuencias así obtenidas fueron comparadas con el propósito de determinar su similitud.

4.4.1 SECUENCIACIÓN DEL ADN 16S

El primer paso en la caracterización de los aislados obtenidos fue la determinación de la especie bacteriana. Tras amplificar mediante PCR el ADNr 16S, este fue secuenciado y la secuencia obtenida fue comparada con las depositadas en las bases de datos utilizando el programa BLAST®.

Los 132 aislados identificados a partir de las muestras resultaron pertenecer al género *Lactobacillus*. De los aislados obtenidos del queso Cabrales E, 56 pertenecen a la especie *L. reuteri*, 11 a la especie *L. vaginalis* y 1 a la especie *L. parabuchneri*.

Los 64 aislados del queso Emmental 1 se agrupan dentro de la especie *L. parabuchneri*. En el Anexo 1 se muestran las distintas especies y el queso del que proceden.

4.4.2 MACRORRESTRICCIÓN-PFGE

Todos los aislados procedentes del queso Cabrales E fueron caracterizados por macrorrestricción de su genoma y posterior separación y visualización de los fragmentos generados mediante PFGE. Sin embargo, de los aislados procedentes del queso Emmental 1, sólo los 22 obtenidos en el cribado sin fase de enriquecimiento fueron caracterizados por esta técnica. El hecho de no haberse realizado un enriquecimiento, nos permitirá tener una idea más real de cual es la distribución de las cepas productoras de histamina en el queso.

Para el análisis de macrorrestricción de los aislamientos seleccionados se valoraron tres endonucleasas. Inicialmente se probó el enzima *SfiI*, utilizado por Kotzamanidis *et al.* (2010) y por Herrero-Fresno *et al.* (2012) para la caracterización de cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*. Sin embargo, este enzima no era capaz de cortar el ADN de los aislados clasificados como *L. reuteri*, posiblemente debido a que dichas bacterias tengan un sistema de modificación-restricción que proteja su ADN frente a la mencionada nucleasa. En la figura 11 se puede comprobar que los aislados de la especie *L. reuteri* no son digeridos con *SfiI*, apareciendo una única banda correspondiente al ADN intacto. Por el contrario, *Lactobacillus casei* ATCC393,

utilizado como control, presenta un patrón de bandas claramente definido indicativo de que la restricción había tenido lugar correctamente.

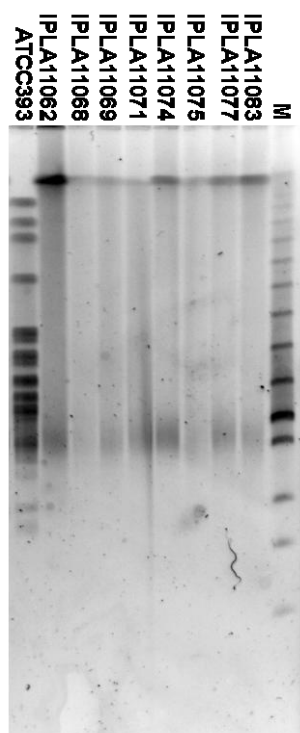


Figura 11: PFGE. Perfiles generados por *Sfi*I a partir de los aislados de *L. reuteri*. Calle 1: *L. casei* ATCC393; calle 2-9 perfiles generados a partir de las cepas *L. reuteri* IPLA 11062, IPLA 11068, IPLA 11069, IPLA 11071, IPLA 11074, IPLA 11075, IPLA 11077 e IPLA 11083; M: Low Range PFG Marker (New England Biolabs).

En la literatura se encontró que el enzima de restricción *Apa*I también había sido utilizado para la caracterización de cepas del género *Lactobacillus* mediante el empleo de técnicas de macrorrestricción (Markiewicz *et al.*, 2010). Como se observa en la figura 12, este enzima es capaz de digerir el ADN de todas las especies de *Lactobacillus* aisladas. Los perfiles obtenidos se nombraron con la primera letra del enzima de restricción, seguida de la primera letra de la especie y de un número.

Con este enzima las cepas de la especie *L. reuteri* se clasificaron en 2 perfiles, que se designaron como Ar1 y Ar2. Como cepas de referencia se utilizaron las cepas de colección *L. reuteri* CECT925 y SD2112. La mayoría de los aislados de esta especie (91%) mostraron el perfil Ar1.

En la especie *L. parabuchneri* se generaron 4 perfiles diferentes denominados Ap1 a Ap4. Sólo uno de los aislados pertenecientes a esta especie, el único que procedía de

queso Cabrales mostró el perfil Ap1. El resto de los aislados, procedentes de queso Emmental, se distribuyeron de la siguiente manera: un aislado en el perfil Ap2, 17 aislados en el perfil Ap3 y 2 aislados en el perfil Ap4. En el caso de *L. parabuchneri* se utilizó como control una cepa de colección, *L. parabuchneri* DSM5987 (microorganismo productor de histamina), que mostró un perfil de bandas distinto a los obtenidos por los microorganismos aislado en nuestro laboratorio.

En la especie *L. vaginalis* se generaron 2 perfiles nombrados Av1 y Av2. Sólo uno de los aislados se corresponde con el perfil Av2, el resto corresponden al perfil Av1.

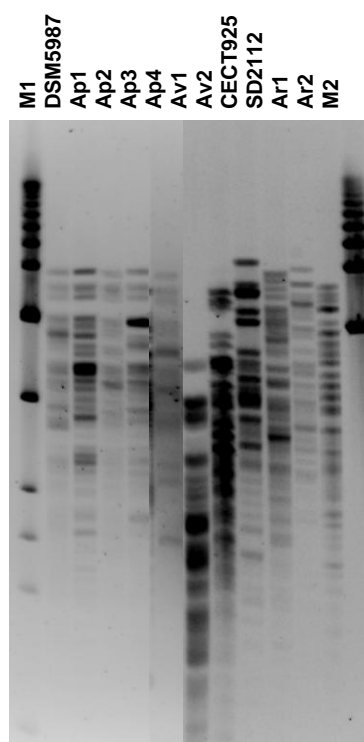


Figura 12: Perfiles generados por *ApaI*. Calle 2: *L. parabuchneri* DSM5987, calles 3 a 6: perfiles de macrorrestricción de las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11117, IPLA 11131, IPLA 11133 e IPLA 11129; calles 7 y 8: perfiles de macrorrestricción de las cepas *L. vaginalis* IPLA 11050 e IPLA 11060; calle 9: *L. reuteri* CECT925; calle 10: *L. reuteri* SD2112; calles 11 y 12: perfiles de macrorrestricción de las cepas *L. reuteri* IPLA 11062 e IPLA 11061. M1: Low Range PFG Marker; M2: Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs).

Debido a que el número de bandas generado con el enzima *ApaI* es demasiado elevado, lo que hace que las bandas posean un pequeño tamaño en alguna de las especies, y no se obtenían unos perfiles con elevada resolución, se realizó otra macrorrestricción con el

enzima *NotI*, el cual también había sido descrito en la caracterización de bacterias del género *Lactobacillus* utilizando esta técnica (Kahala *et al.*, 2008; Markiewicz *et al.*, 2010). El enzima generó unos perfiles con un menor número de bandas y, por tanto, fragmentos de ADN de mayor tamaño. En la figura 13 se muestran los perfiles generados con el enzima *NotI*. Los microorganismos se distribuyeron del mismo modo que cuando se utilizaba la macrorrestricción con el enzima *ApaI*. Para diferenciarlos seguimos la misma nomenclatura que en el caso anterior Nr1 y Nr2 para *L. reuteri*, Np1 a Np5 para *L. parabuchneri* y Nv1 y Nv2 para *L. vaginalis*.

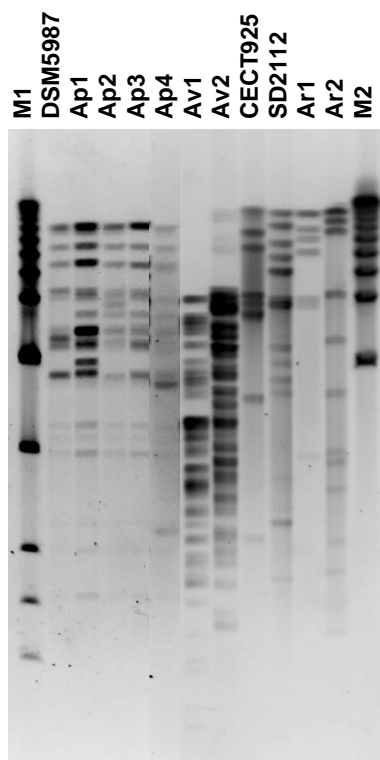


Figura 13: Perfiles generados por *NotI*; Calle 2: *L. parabuchneri* DSM5987, calles 3 a 6: perfiles de macrorrestricción de las cepas *L. parabuchneri* IPLA 11117, IPLA 11131, IPLA 11133 e IPLA 11129; calles 7 y 8: perfiles de macrorrestricción de las cepas *L. vaginalis* IPLA 11050 e IPLA 11060; calle 9: *L. reuteri* CECT925; calle 10: *L. reuteri* SD2112; calles 11 y 12: perfiles de macrorrestricción de las cepas *L. reuteri* IPLA 11062 e IPLA 11061. M1: Low Range PFG Marker; M2: Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs).

En el Anexo 1 se incluye una tabla en la que se muestra el número de cepa, la especie a la que pertenece, el perfil de macrorrestricción que posee y el queso al que pertenece.

4.4.3 SECUENCIACIÓN DEL GEN *hdcA*

Dentro de la caracterización genética de las bacterias productoras de histamina aisladas se llevó a cabo la comparación nucleotídica del gen que codifica la histidina descarboxilasa. Para ello, un fragmento del gen *hdcA* fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos cebadores *hdc3* y *hdc4* descritos por Coton & Coton (2005). El gen *hdcA* de un representante de cada cepa fue secuenciado y las secuencias obtenidas se compararon utilizando el programa Clone Manager 7. En el dendrograma de la figura 14 se observan dos agrupaciones, dentro de las cuales hay gran similitud entre los genes. En una de las agrupaciones se encuentran las cepas de *L. parabuchneri* (IPLA11117, IPLA11129, IPLA11131 e IPLA11133). Dentro de esta rama podemos diferenciar un subgrupo que se corresponde con los genes de las tres cepas procedentes del queso Emmental, los cuales se parecen más entre si que con el de la cepa procedente de queso Cabrales (*L. parabuchneri* IPLA11117). Estos datos se corresponden con la caracterización de las cepas mediante PFGE, donde se vio que la cepa procedente de Cabrales era distinta a las procedentes de Emmental.

En la otra rama del dendrograma se agrupan por un lado las dos cepas de *L. vaginalis* (IPLA11050 e IPLA11060) y por otro la cepa *L. reuteri* IPLA11062. Los genes *hdcA* de las especies *L. vaginalis* y *L. reuteri*, aunque distintos, presentan mayor similitud entre si que con el gen de la especie *L. parabuchneri*.

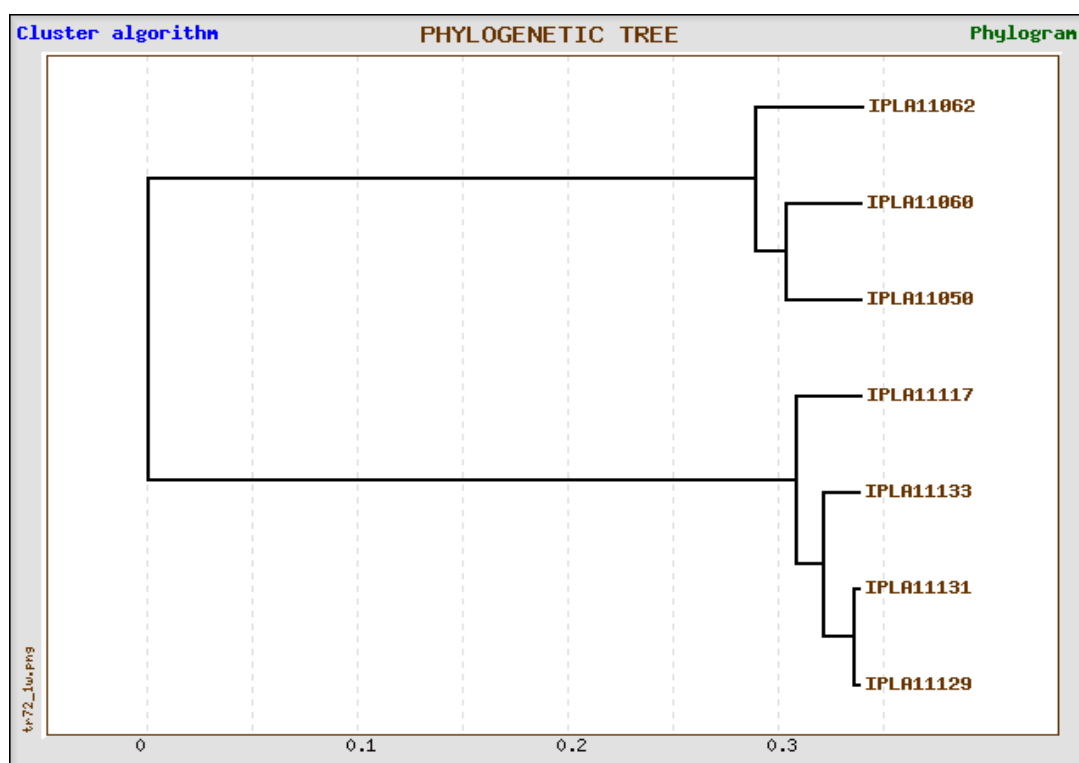


Figura 14: Árbol filogenético de las secuencias del gen *hdcA* de las cepas *L. reuteri* IPLA11062, *L. vaginalis* IPLA11060 e IPLA 11050 y *L. parabuchneri* IPLA11117, IPLA11133, IPLA11131 e IPLA11129 (http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html).

En la figura 15 se incluye la comparación de las secuencias de estas cepas.

```

L.vaginalis-IPLA11050      GGGCAAAAGAATGCT-TACATTGGGTCAATTAACATGACCACTGCTTCAT 49
L.vaginalis-IPLA11060      GGAGTGATTTAGGCT-TACATTGG-TCAATTAACATGACCACTGCTTCAT 48
L.reuteri-IPLA11062        --GCACAATGATGCT-TTCATTGGGTCAATTAACATGACCACTGCTTCAT 47
L.parabuchneri-IPLA11131   -----AAAAATGCCCTATATTGGGACAATTAACATGACTACCGCATCAA 44
L.parabuchneri-IPLA11129   -----AAAAAATGCCCTATATTGGGACAATTAACATGACTACCGCATCAA 45
L.parabuchneri-IPLA11117   -GGGGAAAAAATGCC-TATATTGGGACAATTAACATGACTACCGCATCAA 48
L.parabuchneri-IPLA11133   -----AAAAAATGCCCTATATTGGGACAATTAACATGACTACCGCATCAA 45
                               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
L.vaginalis-IPLA11050      CATTACCGGTCCCTCAAGGT-CACTGTATTGGTTATGACCTATTGAGAAA 98
L.vaginalis-IPLA11060      CATTACCGGTCCCTCAAGGT-CACTGTATTGGTTATGACCTATTGAGAAA 97
L.reuteri-IPLA11062        CATTACCGGTCCCTCAAGGT-CACTGTATTGGTTATGACCTATTGAGAAA 96
L.parabuchneri-IPLA11131   GTTTCTCTGGTGTAGGAGGAACAGT-TCTTGGATATGACATTCTTCGTAA 93
L.parabuchneri-IPLA11129   GTTTCTCTGGTGTAGGAGGAACAGT-TCTTGGATATGACATTCTTCGTAA 94
L.parabuchneri-IPLA11117   GTTTCTCTGGTGTAGGAGGAACAGT-TCTTGGATATGACATTCTTCGTAA 97
L.parabuchneri-IPLA11133   GTTTCTCTGGTGTAGGAGGAACAGT-TCTTGGATATGACATTCTTCGTAA 94
                               ** *  ***      ***  ** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
L.vaginalis-IPLA11050      CCCTGAAGTTGATAAAGCTGAACCACTCTTTACTGAAAAGCAATGGGATG 148
L.vaginalis-IPLA11060      CCCTGAAGTTGATAAAGCTGAACCACTCTTTACTGAAAAGCAATGGGATG 147
L.reuteri-IPLA11062        CCCTGAAGTTGATAAAGCTGAACCACTCTTTACTGAAAAGCAATGGGATG 146
L.parabuchneri-IPLA11131   CCCAGAAGTTGATAAAGCTAAGCCTTTATTTACTGAAAAGCAATGGGACG 143
L.parabuchneri-IPLA11129   CCCAGAAGTTGATAAAGCTAAGCCTTTATTTACTGAAAAGCAATGGGACG 144
L.parabuchneri-IPLA11117   CCCAGAAGTTGATAAAGCTAAGCCTTTATTTACTGAAAAGCAATGGGACG 147
L.parabuchneri-IPLA11133   CCCAGAAGTTGATAAAGCTAAGCCTTTATTTACTGAAAAGCAATGGGACG 144
                               *** *****  *** *  ** *  ***** ***** *  *  *  *  *
L.vaginalis-IPLA11050      GCAGTGAATTACCAATTTACGATGCTAAGCCATTACAAGATGCCCTTAGTT 198
L.vaginalis-IPLA11060      GCAGTGAATTACCAATTTACGATGCTAAGCCATTACAAGATGCCCTTAGTT 197
L.reuteri-IPLA11062        GCAGTGAATTACCAATTTACGATGCTAAGCCATTACAAGATGCCCTTAGTT 196
L.parabuchneri-IPLA11131   GTAGCGAGTTACCAATTTACGACGCAAAGCCTCTGCAAGATACATTGGTT 193
L.parabuchneri-IPLA11129   GTAGCGAGTTACCAATTTACGACGCAAAGCCTCTGCAAGATACATTGGTT 194
L.parabuchneri-IPLA11117   GTAGCGAGTTACCAATTTACGACGCAAAGCCTCTGCAAGATACATTGGTT 197
L.parabuchneri-IPLA11133   GTAGCGAGTTACCAATTTACGACGCAAAGCCTCTGCAAGATACATTGGTT 194
                               *  *  *  *  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
L.vaginalis-IPLA11050      GAATACTTTGGTGTGAATGATGATCGTCGTCCTACTACCCAGCTCCAGGTT 248
L.vaginalis-IPLA11060      GAATACTTTGGTGTGAATGATGATCGTCGTCCTACTACCCAGCTCCAGGTT 247
L.reuteri-IPLA11062        GAATACTTTGGTGTGAATGATGATCGTCGTCCTACTACCCAGCTCCAGGTT 246
L.parabuchneri-IPLA11131   GAATACTTTGGTACCAAAGACGATATGCGTCATTATCCAGCTCCTGGTGC 243
L.parabuchneri-IPLA11129   GAATACTTTGGTACCAAAGACGATATGCGTCATTATCCAGCTCCTGGTGC 244
L.parabuchneri-IPLA11117   GAATACTTTGGTACCAAAGACGATATGCGTCATTATCCAGCTCCTGGTGC 247
L.parabuchneri-IPLA11133   GAATACTTTGGTACCAAAGACGATATGCGTCATTATCCAGCTCCTGGTGC 244
                               *****  ** *  *  *  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *
L.vaginalis-IPLA11050      ATTCATTGTTTGTGCTAACAAAGGTGTTACTGCAGAACGGCCAATGAATG 298
L.vaginalis-IPLA11060      ATTCATTGTTTGTGCTAACAAAGGTGTTACTGCAGAACGGCCAATGAATG 297
L.reuteri-IPLA11062        ATTCATTGTTTGTGCTAACAAAGGTGTTACTGCAGAACGGCCAATGAATG 296
L.parabuchneri-IPLA11131   TTTTGTATGCTGTGCTAACAAAGGTGTCCTACTGCAGAACGTCCAAAGAATG 293
L.parabuchneri-IPLA11129   TTTTGTATGCTGTGCTAACAAAGGTGTCCTACTGCAGAACGTCCAAAGAATG 294
L.parabuchneri-IPLA11117   TTTTGTATGCTGTGCTAACAAAGGTGTCCTACTGCAGAACGTCCAAAGAATG 297
L.parabuchneri-IPLA11133   TTTTGTATGCTGTGCTAACAAAGGTGTCCTACTGCAGAACGTCCAAAGAATG 294
                               ** *  *****  *****  *****  *****  *****

```

```

L.vaginalis-IPLA11050      ATGCAGATATGAAGCCTGGTCAAGGCTATGGTGTGGTTCAGCAATTGCT 348
L.vaginalis-IPLA11060      ATGCAGATATGAAGCCTGGTCAAGGCTATGGTGTGGTTCAGCAATTGCT 347
L.reuteri-IPLA11062        ATGCAGATATGAAGCCTGGTCAAGGCTATGGTGTGGTTCAGCAATTGCT 346
L.parabuchneri-IPLA11131   ATGAAGACATGAAGCCAGGCCAAGGCTATGGTGTATGGTCTGCTATTGCA 343
L.parabuchneri-IPLA11129   ATGAAGACATGAAGCCAGGCCAAGGCTATGGTGTATGGTCTGCTATTGCA 344
L.parabuchneri-IPLA11117   ATGAAGACATGAAGCCAGGCCAAGGCTATGGTGTATGGTCTGCTATTGCA 347
L.parabuchneri-IPLA11133   ATGAAGACATGAAGCCAGGCCAAGGCTATGGTGTATGGTCTGCTATTGCA 344
*** ** ***** ** ***** ***** ** *****

L.vaginalis-IPLA11050      CTTTCCTTTGCTAAGGATCCTTCAAAGGACTCCAGTATGTTTATTGAAGT 398
L.vaginalis-IPLA11060      CTTTCCTTTGCTAAGGATCCTTCAAAGGACTCCAGTATGTTTATTGAAGA 397
L.reuteri-IPLA11062        CTTTCCTTTGCTAAGGATCCTTCAAAGGACTCCAGTATGTTTATTGAAGA 396
L.parabuchneri-IPLA11131   ATTTCAATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAAG 393
L.parabuchneri-IPLA11129   ATTTCAATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAAG 394
L.parabuchneri-IPLA11117   ATTTCAATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAAG 397
L.parabuchneri-IPLA11133   ATTTCAATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAA-G 393
**** ***** * ** * ** ***** ****

L.vaginalis-IPLA11050      GGGGGGGGTT-TTGGGAAAAA-- 418
L.vaginalis-IPLA11060      TGCTGGTGT-T--GGAACCA-- 415
L.reuteri-IPLA11062        TGTGGGTGGT-TT--GGACCG-- 414
L.parabuchneri-IPLA11131   GGGGGGGGTT-TGGGAAAAA-- 413
L.parabuchneri-IPLA11129   GGGGGGGGTT-TTGGGAAAAA-- 414
L.parabuchneri-IPLA11117   GGGGGGGGTTGTTGGGAAA--- 417
L.parabuchneri-IPLA11133   GGGGGGGGTT-TTGGGACAACA 415
* ** * * * *

```

Figura 15: Comparación de las secuencias de *hdcA* de las cepas aisladas.

5. **CONCLUSIONES**

5. CONCLUSIONES

1. Un 7% de las 960 microorganismos aislados de queso Cabrales fueron capaces de producir histamina.
2. Todos los aislados de Cabrales productores de histamina se identificaron como bacterias del género *Lactobacillus*: 56 pertenecían a la especie *L. reuteri*, 11 a *L. vaginalis* y 1 a *L. parabuchneri*.
3. Un 21% de los 370 microorganismos aislados de queso Emmental fueron capaces de producir histamina.
4. Todos los aislados de Emmental productores de histamina se identificaron como bacterias de la especie *L. parabuchneri*
5. El análisis de macrorrestricción con los enzimas *ApaI* y *NotI*, seguido de electroforesis en campo pulsante, permitió clasificar los aislados en 2 perfiles diferentes en la especie *L. reuteri*, 2 perfiles en la especie *L. vaginalis* y 4 perfiles en la especie *L. parabuchneri*.
6. La cepa de *L. parabuchneri* aislada de Cabrales pertenecía a un perfil distinto a las aisladas de Emmental.
7. Todas las cepas productoras de histamina eran portadoras del gen *hdcA*
8. La comparación de las secuencias del gen *hdcA* muestra diferencias entre las distintas cepas, aunque menores que las diferencias interespecíficas, permitiendo su agrupación en función de la especie de la que proceden
9. El gen *hdcA* de *L. reuteri* comparte mayor similitud con el de *L. vaginalis* que con el de *L. parabuchneri*, de forma que el gen *hdcA* de *L. reuteri* y el de *L. vaginalis* se agrupan en la misma rama del árbol filogenético.
10. Los genes *hdcA* de las cepas de *L. parabuchneri* procedentes de Emmental comparten mayor similitud entre ellos que con el de la cepa de *L. parabuchneri* procedente de Cabrales.

6. **BIBLIOGRAFÍA**

6. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, SF, Madden, TL, Schaffer, AA, Zhang, JH, Zhang, Z, Miller, W & Lipman, DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*; **25**: 3389-3402.
- Ayhan, K, Kolsarici N & Ozkan, GA. (1999). The effects of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. *Meat Science* **53**: 183-188.
- Barton, BM, Harding, GP, Zuccarelli AJ. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Analytical Biochemistry* **226**: 235–240.
- Bjeldanes, LF, Schutz, DE & Morris, MM. (1978). Etiology of scombroid poisoning. Cadaverine potentiation of histamine toxicity in Guineapig. *Food and Cosmetics Toxicology*. **16**: 157-159.
- Bodmer, S, Imark, C & Kneubühl, M. (1999). Biogenic amines in foods : histamine and food processing. *Inflamm. Res.* **48**: 296-300.
- Bover-Cid, S, Izquierdo-Pulido, M, Vidal-Carou, MC. (2001). Mixed starter cultures to control biogenic amine production in dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* **63**:1556-1562.
- Burdychova, R & Komprda, T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol Lett.* **276**:149-155.
- Coruzzi, G, Morini, G, Adami, M & Grandi, D. (2001). Role of histamine H3 receptors in the regulation of gastric functions. *Physiol. Pharmacol.* **52**: 539-553.
- Coton, E, Rollan, GC & Lonvaud-funel, A. (1998). Histidine carboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: Purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *Journal of Applied Microbiology*. **84**: 143- 151.
- Coton, E & Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine and tyramine producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **63**: 296- 304.
- Fernández, M, del Río, B, Linares, DM, Martín, MC & Álvarez, MA. (2006). Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *J. Dairy Sci.* **8**: 3763-3769.

- Fernández, M, Linares, DM, del Río, B, Ladero, V, & Alvarez, MA.** (2007a). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *J. Dairy Res.* **74**: 276-282.
- Fernández, M & Zúñiga, M.** (2006) Amino acid catabolic pathways in lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **32**: 155-183.
- Herrero-Fresno, A, Martínez, N, Sánchez-Llana, E, Díaz, M, Fernández, M, Martín, M, Ladero, V & Alvarez, MA.** (2012). *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *Int. J. Food Microbiol.* **157**: 297-304.
- Jarisch, R.** (2004). Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit. 2nd ed. Thieme, Stuttgart.
- Joosten, HMLJ & Northolt, MD.** (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese 2. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* **41**: 259-280.
- Jørgensen, EA, Knigge, U, Warberg, J & Kjær, A.** (2007). Histamine and the regulation of body weight. *Neuroendocrinology.* **86**: 210-214.
- Igarashi, K, Ito, K & Kashiwagi, K.** (2001). Polyamine uptake system in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **152**: 271-278.
- Kahala, M, Mäki, M, Lehtovaara, A, Tapanainen, J-M, Katiska, R, Juuruskorpi, M, Johola, J & Joutsjoki, V.** (2008). Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product viili. *Journal of Applied Microbiology.* **105**: 1929-1938.
- Kandler, O.** (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* **49**: 209-224.
- Komprda, T, Smela, D, Pechova, P, Kalhotka, L, Stencl, J, Klejdus, B.** (2004). Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Science.* **67**:607-616.
- Konagaya, Y, Kimura, B, Ishida, M & Fujii, T.** (2002). Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium. *Journal of Applied Microbiology.* **92**: 1136-1142.
- Kotzamanidis, C, Kourelis, A, Litopoulou-Tzanetaki, E, Tzanetakis, N & Yiangou, M.** (2010). Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. **140**: 154-163.

- Ladero, V, Linares, DM, Fernández, M, & Alvarez MA.** (2008). Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content. *Food Research International*. **41**: 1015-1019.
- Ladero, V, Calles-Enríquez, M, Fernández, M & Alvarez, MA.** (2010a). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition Food Sci.***6**: 145-156.
- Ladero, V, Sánchez-Llana, E, Fernández, M, & Alvarez MA.** (2010b). Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International Journal of Food Science and Technology*. **46**: 516-521.
- Lane, DJ** (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- Lehane, L & Olley, J.** (2000). Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* **58**: 1-37.
- Linares, DM, Martín, MC, Alvarez, MA & Fernandez, M.** (2011). Biogenic amines in dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **51**: 691-703.
- Linsalata, M & Russo, F.** (2008) Nutritional factors and polyamine metabolism in colorectal cancer. *Nutrition.* **24**: 382-389.
- Lucas P, Wolken WAM, Claisse O, Lolkema JS & Lonvaud-funel A.** (2005). Histamine-producing pathway encoded on an instable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Applied and Environmental Microbiology.* **71**: 1417-1424.
- Maijala, R & Eerola, S.** (1993). Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science* **35**: 387-395.
- Maintz, L & Novak, N.** (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition.* **85**: 1185-1196.
- Makarova, KS & Koonin, EV.** (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*; **189**: 1199-1208.
- Markiewicz, LH, Biedrzycka, E, Wasilewska, E & Bielecka, M.** (2010). Rapid molecular identification and characteristics of *Lactobacillus* strains. **55**: 481-488.
- Martín, MC, Fernández, M, Linares, DM, & Alvarez, MA.** (2005). Sequencing, characterization and transcriptional análisis of the histidina decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology.* **151**: 1219-1228.

- McCabe-Sellers, BJ, Staggs, CG & Bogle, ML.** (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *J. Food Compost. Anal.* **19**: 58-65.
- Neely, MN & Olson, ER.** (1996). Kinetics of expression of the *Escherichia coli* cad operon as a function of pH and lysine. *Journal of Bacteriology* **178**: 5522-5528.
- Ogier, JC, Son, O, Gruss, A, Tailliez, P & Delacroix-Buchet, A.** (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology.* **68**: 3691-3701.
- Önal, A.** (2007) A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* **103**: 1475-1486.
- Passani, MB, Giannoni, P, Bucherelli, C, Baldi, E & Blandina, P.** (2007). Histamine in the brain: beyond sleep and memory. *Biochem. Pharmacol.* **73**: 1113-1122.
- Raibaud, P, Caulet, M, Galpin, JV & Mocquot, G.** (1961). Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *J Appl Bacteriol* **24**: 285-306.
- Ranganchari, PK.** (1992). Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am. J. Physiol.* **262**: 1-13.
- Rauscher-Gaberning, E, Grossgut, R, Bauer, F & Paulsen, P.** (2009). Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. *Food Control.* **20**: 423-429.
- Rice SL, Eitenmiller RR & Koehler PE.** (1976). Biologically active amines in food: review. *Journal of Milk and Food Technology.* **39**: 353-358.
- Schelp, E, Worley, S, Monzingo, AF, Ernst, S & Robertus JD.** (2001) pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. *J. Mol. Biol.* **306**: 727-732.
- Settanni, L & Moschetti, G.** (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* **27**: 691-697.
- Shalaby, AR.** (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **29**: 675-690.
- Silla Santos, MH.** (1996). Biogenic amines: Their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**: 213-231.
- 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, Alvarez, M, Fernández, M, Lopez, P, de Palencia, PF, Corbi, A, Trip, H & Lolkema, JS.** (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European J. Clin. Nutrition.* **64**: 95-100.
- Stackebrandt, E & Teuber, M.** (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*; **70**: 317-324.
- Tabor, CW & Tabor, H.** (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* **49**: 81-99.
- Taylor, SL.** (1986). Histamine poisoning: Toxicology and clinical aspects. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **17**: 91-128.
- Ten Brink, B, Damink, C, Joosten, HMLJ & Huis in't Veld, JHJ.** (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**: 73-84.
- Treviño, E, Beil, D & Steinhart, H.** (1997). Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage. *Food Chemistry.* **60**: 521-526.
- Trip, H, Mulder, NL, Rattray, FP & Lolkema, JS.** (2011). HdcB, a novel enzyme catalysing maturation of pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase. *Mol. Microbiol.* **69**: 861-871
- Turner, S, Pryer, KM, Miao, VPW, and Palmer, JD.** (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**: 327–338.
- Van de Guchte, M, Serror, P, Chervaux, C, Smokvina, T, Ehrlich, SD & Maguin, E.** (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **82**: 187-216.
- Vanderslice, P, Copeland, WC & Robertus JD.** (1986). Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 5186- 5191.
- Vanpoelje, PD & Snell, EE.** (1990). Cloning, sequencing, expression, and site-directed mutagenesis of the gene from *Clostridium perfringens* encoding pyruvoyl-dependent histidine-decarboxylase. *Biochemistry* **29**: 132-139.
- Vido, K, Le Bars, D, Mistou, MY, Anglade, P, Gruss, A & Gaudu, P.** (2004). Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: Involvement of the proteolytic system. *J. Bacteriol.* **186**: 1648-1657.

Wöhrl, S, Hemmer, W, Focke, M, Rappersberger, K & Jarisch, R. (2004).
Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral
provocation with liquid histamine. *Allergy Asthma Proc.* **25**: 305-311.

7. **ANEXOS**

ANEXO 1

Número de cepa	Especie	Perfil macrorrestricción	Perfil macrorrestricción	Queso de procedencia
IPLA11050	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11051	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11052	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11053	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11054	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11055	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11056	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11057	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11058	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11059	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av1	Nv1	Cabrales E
IPLA11060	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	Av2	Nv2	Cabrales E
IPLA11061	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11062	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar1	Nr1	Cabrales E
IPLA11063	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar1	Nr1	Cabrales E
IPLA11064	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar1	Nr1	Cabrales E
IPLA11065	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar1	Nr1	Cabrales E
IPLA11066	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar1	Nr1	Cabrales E
IPLA11067	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11068	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11069	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11070	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11071	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11072	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11073	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11074	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11075	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11076	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11077	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11078	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11079	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11080	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11081	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11082	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11083	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11084	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11085	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11086	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11087	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E

IPLA11088	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11089	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11090	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11091	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11092	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11093	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11094	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11095	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11096	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11097	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11098	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11099	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11100	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11101	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11102	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11103	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11104	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11105	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11106	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11107	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11108	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11109	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11110	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11111	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11112	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11113	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11114	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11115	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11116	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ar2	Nr2	Cabrales E
IPLA11117	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap1	Np1	Cabrales E
IPLA11118	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11119	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11120	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11121	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11122	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11123	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11124	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11125	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11126	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11127	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11128	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap4	Np4	Emmental 1
IPLA11129	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap4	Np4	Emmental 1
IPLA11130	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1

IPLA11131	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap2	Np2	Emmental 1
IPLA11132	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11133	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11134	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11135	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11136	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11137	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1
IPLA11139	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ap3	Np3	Emmental 1