



Universitat Autònoma de Barcelona

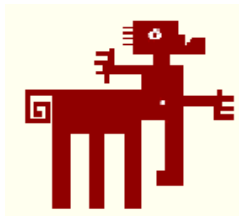
# **Evaluación del desarrollo de aminas biógenas en queso chihuahua durante la vida de anaquel**

**Tesis Doctoral**

**Para acceder al grado de doctor dentro del programa de  
Doctorado en Ciencia de los Alimentos**

**María Teresa González Martínez**

**Septiembre 2013**



**Evaluación del desarrollo de aminas biógenas en  
queso chihuahua durante la vida de anaquel**

**Tesis Doctoral**

---

María Teresa González Martínez

---

Dra. Blanca Edelia González Martínez  
Directora de la tesis

---

Dra. Manuela Hernández Herrero  
Tutora

## CONTENIDO

<b>CAPITULO I .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS GENERALES Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. OBJETIVO GENERAL .....	3
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
1.3. PLAN DE TRABAJO .....	4
1.4. BIBLIOGRAFÍA .....	5
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>7</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>7</b>
2. QUESOS Y SUS CARACTERÍSTICAS .....	7
2.1. ELABORACIÓN DE QUESOS .....	7
2.1.1. <i>Quesos en México</i> .....	8
2.1.2. <i>Quesos frescos</i> .....	10
2.1.3. <i>Quesos madurados</i> .....	11
2.2. MICROORGANISMOS EN LOS QUESOS .....	16
2.2.1. <i>Bacterias ácido lácticas (BAL)</i> .....	16
2.2.2. <i>Microorganismos en quesos que afectan la salud</i> .....	19
2.3.-AMINAS BIÓGENAS .....	20
2.3.1. <i>Enzimas descarboxilasas</i> .....	21
2.3.2. <i>Microorganismo con enzima aminoácido descarboxilasa</i> .....	22
2.3.3. <i>Enzimas del organismo humano que degradan aminas biógenas</i> .....	22
2.3.4. <i>Principales aminas biógenas y su efecto en la salud</i> .....	23
2.3.5. <i>Aminas biógenas en quesos</i> .....	27
2.3.6. <i>Prevención de la producción de aminas biógenas en alimentos</i> .....	28
2.4. MÉTODOS PARA INVESTIGACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS Y LOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES .....	28
2.4.1. <i>Método específico para identificar bacterias con enzima amino descarboxilasa</i> .....	29
2.4.2. <i>Métodos cromatográficos: identificación y cuantificación de aminas biógenas</i> .....	29
2.4.3. <i>Métodos moleculares para la detección de genes que codifican para enzimas amino descarboxilasas</i> .....	31
2.5. BIBLIOGRAFÍA .....	34
<b>CAPITULO III .....</b>	<b>46</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>

3. MUESTRAS DE QUESOS .....	46
3.1. CODIFICACIÓN Y ALMACENAMIENTO.....	46
3.2. MICROORGANISMOS CONTROL CON ENZIMA HISTIDINA Y TIROSINA DESCARBOXILASA.....	46
3.3. CARACTERIZACIÓN DE QUESOS.....	46
3.3.1. <i>Determinación de la concentración de NaCl</i> .....	47
3.3.2. <i>Determinación del porcentaje de proteína y nitrógeno</i> .....	47
3.3.3. <i>Determinación del porcentaje de nitrógeno amoniacal</i> .....	47
3.3.4. <i>Humedad por el Método AOAC 926.08</i> .....	48
3.3.5. <i>Determinación del pH de las muestras de queso</i> .....	48
3.3.6. <i>Determinación de grasa de las muestras de queso</i> .....	48
3.3.7. <i>Determinación de cenizas de las muestras de queso</i> .....	48
3.3.8. <i>Calidad microbiológica de quesos</i> .....	48
3.3.9. <i>Cuenta de mesófilos aerobios</i> .....	49
3.3.10. <i>Cultivo para bacterias coliformes</i> .....	49
3.3.11. <i>Hongos y levaduras</i> .....	49
3.3.12. <i>Salmonella</i> .....	49
3.3.13. <i>Listeria</i> .....	49
3.3.14. <i>Cuenta de Bacterias Ácido Lácticas (BAL)</i> .....	50
3.4. ANÁLISIS DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE AMINAS BIÓGENAS .....	50
3.4.1. <i>Cultivo de bacterias Gram positivas</i> .....	50
3.4.2. <i>Cultivo de bacterias Gram negativas</i> .....	50
3.4.3. <i>Medios específicos para investigar cepas con la enzima HDC y TDC</i> .....	51
3.4.4. <i>Identificación bioquímica Método API</i> .....	52
3.5. CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA Y TIRAMINA POR HPLC .....	52
3.5.1. <i>Extracción de histamina y tiramina de las muestras de queso</i> .....	52
3.5.2. <i>Estandarización de la técnica</i> .....	53
3.5.3. <i>Cuantificación histamina y tiramina en tres momentos de la vida de anaquel</i> .....	54
3.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE AMINAS BIÓGENAS .....	54
3.6.1. <i>Selección de cepas de referencia usadas como control positivo</i> .....	54
3.6.2. <i>Condiciones del cultivo de las cepas control</i> .....	55
3.6.3. <i>Extracción de DNA de cepas control</i> .....	55
3.6.4. <i>Extracción directa de ADN bacteriano de los quesos</i> .....	55
3.6.5. <i>Comprobación de la presencia de ADN de origen bacteriano extraído de los quesos</i> .....	56
3.6.6. <i>Identificación de los genes <i>hdc</i> y <i>tdc</i></i> .....	57
3.7. BIBLIOGRAFÍA .....	59
<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>62</b>

<b>CARACTERIZACIÓN DE QUESOS CHIHUHUA .....</b>	<b>62</b>
4. INTRODUCCIÓN .....	62
4.1. Características físico-químicas .....	62
4.1.1 Calidad microbiológica .....	63
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	64
4.2.1 Descripción de las muestras analizadas .....	64
4.2.2. Resultados bromatológicos .....	65
4.2.3. Comparación de los resultados encontrados y lo declarado en etiqueta.....	65
4.2.4 Calidad microbiológica de los quesos analizados. ....	69
4.3. CONCLUSIONES.....	71
4.4. BIBLIOGRAFÍA .....	72
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>75</b>
<b>MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE AMINAS BIÓGENAS .....</b>	<b>75</b>
5. INTRODUCCIÓN .....	75
5.1- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	75
5.1.1. Microorganismos con enzimas HDC y TDC.....	75
5.1.2. Bacterias Gram positivas con las enzimas HDC y TDC en medios selectivos. ....	76
5.2.3. Bacterias Gram negativas con las enzimas HDC y TDC en medios selectivos. ....	77
5.2.4-Identificación bioquímica: Método API-CH de cepas positivas con la enzima HDC y TDC.....	78
5.3. CONCLUSIÓN .....	80
5.4 BIBLIOGRAFÍA .....	81
<b>CAPITULO VI .....</b>	<b>84</b>
<b>CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA Y TIRAMINA POR HPLC .....</b>	<b>84</b>
6. INTRODUCCIÓN .....	84
6.1.-ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE HPLC.....	84
6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	86
6.2.1. Determinación de aminas biógenas en tres momentos de la vida de anaquel .....	86
6.3.- CONCLUSIÓN .....	90
6.4. BIBLIOGRAFÍA .....	91
<b>CAPITULO VII.....</b>	<b>95</b>
<b>IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICA PARA LAS ENZIMAS HDC Y TDC EN QUESOS .....</b>	<b>95</b>
7. INTRODUCCIÓN.....	95

7.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	96
7.1.1. <i>Identificación de ADN ribosomal (ADNr) bacteriano extraído directamente de quesos.</i> .....	96
7.1.2 <i>Presencia del gen histidina descarboxilasa</i> .....	96
7.1.3. <i>Presencia del gen tiramina descarboxilasa</i> .....	98
7.1.4. <i>Identificación de los genes histidina descarboxilasa y tirosina descarboxilasa en muestras de queso.</i> .....	99
7.2. CONCLUSIONES .....	103
7.4. BIBLIOGRAFÍA .....	104
<b>8. CONSIDERACIONES FINALES.....</b>	<b>108</b>

<b>INDICE DE TABLAS</b>		Pág.
Tabla 1	Quesos genuinos de las diversas regiones del país.	9
Tabla 2	Quesos y productos similares de venta en México.	10
Tabla 3	Consumo de quesos en México.	12
Tabla 4	Especificaciones físico químicas de queso chihuahua de la Norma NMX-F-209-1985	14
Tabla 5	Principales especies de <i>Lactobacillus</i> y tipo de fermentación.	17
Tabla 6	Productos de la descarboxilación de aminoácidos.	21
Tabla 7	Especificaciones del caldo de cultivo para detectar bacterias amino descarboxilasa.	51
Tabla 8	Condiciones de la fase móvil para cromatografía	54
Tabla 9	Datos de identificación de los quesos analizados.	64
Tabla 10	Resultados del análisis físico-químico al inicio de su vida de anaquel realizadas a las muestras de queso.	65
Tabla 11	Relación de entre lo encontrado y lo declarado de la concentración de sodio, % de proteína y % de grasa.	66
Tabla 12	Contraste de las determinaciones de proteína, grasa, humedad, cenizas, sólidos totales y pH con la Norma NMX-F-209-1985 de quesos chihuahua.	67
Tabla 13	Calidad microbiológica de quesos chihuahua	69
Tabla 14	Quesos que contienen bacterias fermentativas con la enzima histidina y tirosina descarboxilasa.	76
Tabla 15	Identificación bioquímica de cepas de <i>Lactobacillus</i> identificados como productores de histamina y tiramina.	78
Tabla 16	Cuantificación de histamina y tiramina en diferentes momentos de almacenamiento.	86
Tabla 17	Presencia de los genes <i>hdc</i> y <i>tdc</i> en las muestras de quesos.	99
Tabla 18	Comparación de la detección de histamina en quesos por 3 técnicas.	101
Tabla 19	Comparación de la detección de tiramina en quesos por 3 técnicas.	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estrategia general de análisis	4
Figura 2	Esquema de la manufactura de quesos Chihuahua	15
Figura 3	Estructura química de histamina	24
Figura 4	Estructura química de tiramina	26
Figura 5	Reacción de derivatización de O-phthaldialdehído (OPA)	30
Figura 6	Detección de bacterias Gram (+) con las enzimas HDC y TDC en quesos chihuahua en diferentes tiempos.	77
Figura 7	Cromatograma de histamina y tiramina a diferentes concentraciones del estándar	85
Figura 8	Curvas de calibración para las determinaciones de histamina y tiramina	85
Figura 9	Gráfica cuantificación de histamina y tiramina en los quesos al inicio de su almacenamiento	87
Figura 10	Productos de PCR del fragmento del 16S rADN bacteriano	96
Figura 11	Identificación por PCR del gen histidina descarboxilasa ( <i>hdc</i> ).	97
Figura 12	Regiones conservadas seleccionadas para el diseño de oligonucleótidos degenerados para identificar el gen <i>tdc</i> .	98
Figura 13	Producto de PCR con los oligonucleótidos del gen tirosina descarboxilasa ( <i>tdc</i> )	99



## ABREVIATURAS

$a_w$	Actividad de agua
BAL	Bacteria del ácido láctico
CFU	Unidades formadora de colonia
°C	grado Celsius
cols	Colaboradores
DAO	Diamino oxidasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatograficas de gas
HDC	Enzima histidina descarboxilasa
<i>hdc</i>	Gen histidina descarboxilasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IMAO	Inhibidores de la -mono amino oxidasa
MAO	Mono amino oxidasa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSLAB	Bacterias ácido lácticas no iniciadoras
pb	Pares de bases
rtPCR	Reacción en cadena de la polimerasa Tiempo real
TLC	Cromatografía de capa fina
UHPLC	Ultra Cromatografía líquida de alta resolución

## RESUMEN

La inocuidad de los alimentos constituye una de las preocupaciones de la industria de alimentos ya que afecta directamente a la salud de los consumidores.

El queso chihuahua es el queso madurado de mayor consumo en México, la maduración se realiza mediante la adición de microorganismos lácticos, principalmente del género *Lactococcus* y en algunos casos también *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus*. Se ha demostrado que en alimentos madurados se pueden desarrollar aminas biógenas por la presencia de enzimas amino descarboxilasas de los microorganismos fermentadores. El consumo de histamina y tiramina pueden ser de riesgo para los consumidores, en especial para quienes presentan inhibición de la enzima mono amino oxidasa.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el desarrollo de histamina y tiramina en 8 quesos chihuahua elaborados con leche pasteurizada durante la vida de anaquel.

Se inició con el análisis de la calidad microbiológica y físico-química de los quesos requerida por la normatividad vigente, se desarrollaron cultivos en medios selectivos para identificar bacterias del queso con enzimas histidina y tirosina descarboxilasa (HDC y TDC) utilizando un caldo sintético con histidina o tirosina añadido, este estudio se realizó en 4 momentos de la vida de anaquel y para identificar las bacterias ácido láctico (BAL) con enzimas descarboxilasas en las pruebas positivas, se utilizó el sistema bioquímico API 50 CH (Biomérieux). Al mismo tiempo, se cuantificó la presencia de histamina y tiramina por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en tres diferentes momentos, al inicio y a la mitad de la vida de anaquel, y en la fecha de caducidad del producto. Por otra parte, de los quesos se realizó una extracción directa de ADN bacteriano, donde se desarrolló una metodología que incluye un proceso de eliminación de la grasa. Se analizó la presencia de genes que codifican para las enzimas histidina y tirosina descarboxilasa por PCR (reacción de la cadena de la polimerasa) utilizando oligonucleótidos previamente reportados para *hdc* y diseñando nuevos oligonucleótidos para *tdc*.

Los resultados microbiológicos mostraron que los quesos cumplen con la normatividad mexicana para estos productos, la cuenta total de bacterias fue de 3,10 a 3,80 Log UFC/g, de coliformes de 2,6 a 3,4 Log UFC/g. No se detectaron bacterias patógenas como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ni *Staphylococcus aureus*. Los estudios físico químicos muestran variaciones importantes entre las marcas en las concentraciones de sodio, proteína y grasa en

algunos casos los valores encontrados no corresponden a lo declarado en las etiquetas. La detección de microorganismos con enzima HDC al final de la vida de anaquel fue en un 37,5% de las muestras y para microorganismos con la enzima TDC en un 75%. Se identificaron *Lactobacillus pentosus* con enzimas HDC y TDC en 3 productos y *L. rhamnosus* con enzima TDC en 2 productos.

Al inicio del almacenamiento ninguno de los quesos presentaba histamina y solo el 37,5% contenían tiramina en concentraciones de 34 a 122 mg/Kg de queso, mientras que al final de la vida de anaquel en el 75% de los quesos se detectó tiramina (115 a 209 mg/Kg de queso) y en el 37% se encontró histamina (47 a 205 mg/Kg de queso).

En 6 de los 8 quesos analizados (75%) se detectó el gen *tdc*, mientras que en solo 3 (37,5%) se logró detectar el gen *hdc*. Al asociar los resultados de HPLC al final del almacenamiento con la presencia de los genes *tdc* y *hdc* se observa una correlación significativa de 0,001 y 0,024 respectivamente.

Es indispensable disminuir la formación de aminas biógenas en los quesos ya sea por pasteurización de la leche, selección de las cepas iniciadoras y/o con buenas prácticas higiénicas.

## ABSTRAC

Food safety is a concern in the food industry since it directly affects the consumer health. Chihuahua cheese is the mature cheese of major consumption in Mexico; the maturation is realized by adding lactic microorganisms, especially *Lactococcus* and in some cases *Streptococcus thermophiles* and *Lactobacillus*. It has been demonstrated that mature food can develop biogenic amines because of the presence of amino descarboxilasas enzymes of the fermenter microorganisms. The consumption of histamine and tyramine can be risky for consumers, especially for those who present inhibition of monoamine oxidase enzyme.

The aim of this study was to evaluate the development of histamine and tyramine in 8 chihuahua cheeses elaborated with pasteurized milk during its shelf life. It began with the analysis of the microbiological and physical-chemical quality of the cheeses required by current regulations; selective media cultures were developed to identify bacteria in cheeses with enzymes histidine and tyrosine descarboxylase (HDC y TDC) using a synthetic broth with histidine or tyrosine added, this study was made in 4 times of the shelf life and to identify the lactic acid bacteria (BAL) with descarboxilasa enzyme in the positive tests, the biochemical system API 50 CH (Biomerieux) was used.

At the same time, the presence of histamine and tyramine was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) in three different moments, at the beginning and middle of shelf life and at the product expiration. On the other hand, bacterial ADN was extracted directly from cheese to develop a methodology that includes a fat removal process. It was analyzed the presence of genes that encode the histidine and tyrosine descarboxylase enzyme by PCR reaction (Polymerase Chain) using primers previously reported for *hdc* and designing new primers for *tdc*.

The microbiological results showed that the cheeses fulfill the Mexican regulations for these products, the total account of bacteria was from 3,10 to 3,80 Log UFC/g, and coliformes from 2,6 to 3,4 Log UFC/g. Pathogenic bacteria such as *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus* were not found.

The physical-chemical studies show important variations between the marks in the concentrations of sodium, protein and fat, in some cases the values do not correspond to the ones declared in the labels. The detection of microorganisms with enzyme HDC at the end of shelf life was 37,5% of the samples and microorganisms with the enzyme TDC was 75%.

*Lactobacillus pentosus* were identified with enzymes HDC and TDC in 3 products and *L. rhamnosus* with enzyme TDC in 2 products.

At the beginning of storage none of the cheeses had histamine and only 37.5% contained tyramine in concentrations from 34 to 122 mg/Kg of cheese, whereas at the end of the shelf life 75% of the cheeses had tyramine (115 to 209 mg/Kg of cheese) and 37% histamine (47-205 mg/Kg of cheese).

Six of the eight cheeses analyzed (75%) had *tdc* gene whereas only 3 (37,5%) contained the *hdc* gene. The results of HPLC at the end of storage in the presence of *tdc* and *hdc* genes show a significant correlation of 0,001 and 0,024 respectively.

It is indispensable to decrease the formation of biogenic amines in cheeses either by pasteurization of milk, selection of the strains initiators and/or with good hygiene practices.

## **CAPITULO I**

# **INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS GENERALES Y PLAN DE TRABAJO**

### **1. Introducción**

El queso es un producto lácteo con un alto valor nutritivo, forma parte de la canasta básica en México, debido a que es uno de los alimentos de origen animal que más se consumen. La mayoría de los quesos son elaborados con leche de origen bovino y en menor grado de caprino. México cuenta con una gran variedad de quesos de diferentes regiones (panela, oaxaca, cotija, asadero, chihuahua, sierra) y son utilizados en la preparación de comidas típicas como quesadilla, sopes, enchiladas, en forma gratinada o para aderezar diferentes platillos (Instituto Español de Comercio Exterior, 2012). La industria de productos lácteos en el país ha crecido en la producción de quesos según datos estadísticos reportados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2013), la producción de quesos, presentó una tasa de crecimiento promedio de 13,2 % en el periodo comprendido de marzo 2012 a 2013.

Si bien este tipo de queso tuvo su origen en Chihuahua actualmente se elabora por diferentes empresas de todo el país y además es exportado a los Estados Unidos por la demanda de la comunidad hispana (Bricker, 2005). La mayoría de los quesos que se comercializan en el país son elaborados con leche pasteurizada siendo regulados por la Secretaría de Salud a través de la Norma Oficial Mexicana para quesos (NOM-121-SSA1-1994), aunque aún existen quesos artesanales que utilizan leche sin pasteurizar.

Los quesos frescos o sin maduración son los principalmente consumidos en México, entre los madurados el de mayor consumo es el queso chihuahua o llamado también menonita por ser esta comunidad la primera que implemento la tecnología y el método para su elaboración (Renyé *et al.*, 2011; Gutiérrez y Nevárez, 2009). La comunidad Menonita se asentó en la ciudad de Chihuahua por lo que estos quesos llevan esa denominación. De manera errónea el queso chihuahua es considerado como queso cheddar, sin embargo se ha demostrado que las propiedades reológicas, sabor, textura y composición son características particulares del queso chihuahua (Olson *et al.*, 2011; Tunick *et al.*, 2008; Van Hekken *et al.*, 2007, 2006).

La formación de aminos biógenos es más probables en quesos madurados, la histamina y la tiramina las que representan un mayor riesgo para la salud, por su efecto tóxico sobre

diferentes sistemas del organismo por lo que son las aminos más estudiadas. En general el organismo humano normalmente puede eliminar la histamina ingerida en los alimentos (pescados, vinos, quesos), el riesgo se presenta cuando se ingieren altas concentraciones de esta amina, por lo que puede desarrollar síntomas graves de intoxicación. La histamina también ha sido relacionada en la patogénesis de la migraña en individuos que sufren de deficiencias de las enzimas diamino oxidasa (DAO) (Maintz y Novak, 2007).

Los quesos fermentados han sido relacionados con crisis hipertensivas graves en pacientes que por prescripción médica toman medicamentos inhibidores de la enzima mono amino oxidasa (MAO). La amina relacionada con estos eventos es la tiramina por lo que estas manifestaciones clínicas son denominadas “reacción del queso”. (McCabe-Sellers *et al.*, 2006; Sathyanarayana y Yeragani, 2001). A pesar de los efectos tóxicos relacionados con estas aminos hasta la fecha no se ha reglamentado en México la detección de amina biógenas en estos productos.

La histamina y la tiramina se forman por la presencia de microorganismos con enzimas histidina y tirosina descarboxilasa. Dentro de los microorganismos identificados con estas enzimas se encuentran las bacterias ácido láctico, algunas de las cuales son utilizadas como cultivos iniciadores en quesos fermentados (Ordoñez *et al* 1997). Estos cultivos producen proteólisis durante su maduración, para generar los atributos de sabor y aroma características del queso, pero los aminoácidos libres formados son el sustrato para la actividad de las enzimas amino descarboxilasa (Bontinis *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2010).

En esta tesis realizada en quesos Chihuahua, se llevó a cabo la evaluación de la capacidad formadora de histamina y tiramina en medios de cultivo específicos, así como evaluación y cuantificación de éstas aminos mediante HPLC en el queso durante su vida de anaquel.

Además se investigó la presencia en el queso de los genes que codifican para las enzimas histidina y tirosina descarboxilasa (*hdc* y *tdc*), realizando la extracción directa del ADN bacteriano presente en las muestras de quesos e identificando los genes *hdc* y *tdc* por la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), siendo esta un método molecular rápido y sensible para detectarlos.

Realizando la extracción directa de ADN bacteriano de las muestras de quesos se requiere menor tiempo al no realizar cultivos para los diferentes microorganismos, asegurando investigar toda la comunidad microbiana presente en las muestras.

### **1.1. Objetivo general**

Evaluar la formación de histamina y tiramina en quesos chihuahua durante su vida de anaquel y los microorganismos productores de histamina y tiramina identificados por métodos microbiológicos y moleculares.

### **1.2. Objetivos específicos**

- Analizar las características físico-químicas y calidad microbiológicas de quesos chihuahua.
- Identificar por métodos microbiológicos las bacterias con actividad histidina descarboxilasa y tirosina descarboxilasa presentes en los quesos chihuahua.
- Cuantificar la producción de histamina y tiramina en los quesos chihuahua en durante la vida de anaquel.
- Desarrollar un método de PCR para la detección de genes bacterianos con actividad de la enzima amino descarboxilasa en bacterias presentes en quesos fermentados.
- Desarrollar un método de PCR para la detección directa de microorganismos productores de las enzimas histidina descarboxilasa y tirosina descarboxilasa en quesos chihuahua.



### 1.3. Plan de trabajo

La estrategia para el logro de los objetivos propuestos se presenta en la figura 1. Incluye la obtención de las muestras de quesos, caracterización (físico químicas y microbiológicas), análisis microbiológicos para aislar las cepas productoras de aminas, cuantificación de la histamina y tiramina por HPLC, identificación de genes bacterianos productores de histamina y tiramina.

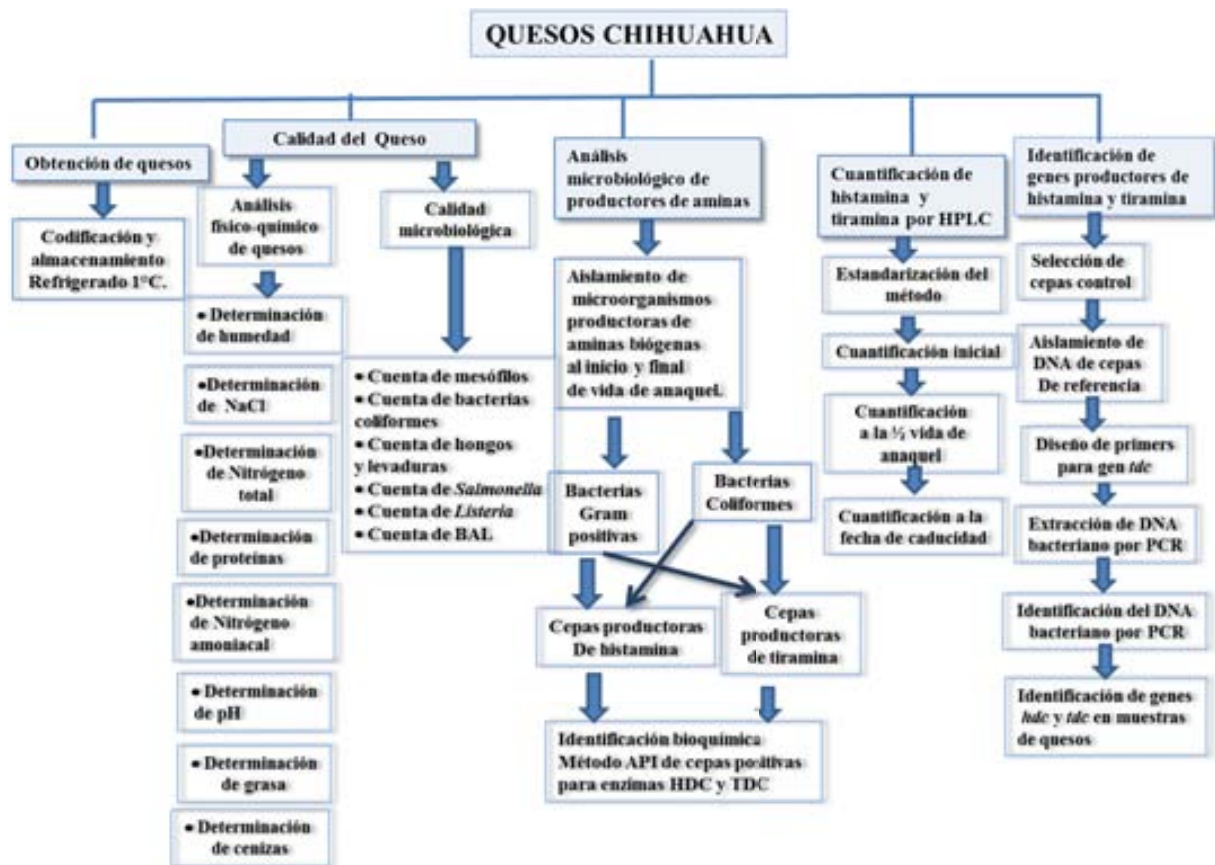


Figura 1. Estrategia general de análisis

#### 1.4. Bibliografía

1. Anónimo. (1994a).-Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos madurados y procesados. Especificaciones.
2. Bontinis T G; MallatouH; Pappa EC; Massouras TH; Alichanidis E. (2012). Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research*, in press.
3. Bricker A L; Van Hekken D L; Guerrero VM; Gardea A A. (2005). Microflora isolated from Mexican Mennonite-style cheeses. *Food Protection Trends*. 25(8):p.637-640.
4. Estadística y Geografía.- México: INEGI. (2013). Boletín de información oportuna del sector alimentario / Instituto Nacional de Estadística y Geografía- México.
5. Fernández-García E; Tomillo J; Núñez M. (1999). Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *Int. Journal. Food Microbiology*. 52, 189–196.
6. Filiz, H.N; Karahan A.G; Cakmakc Oner ML. (2008). Factors Affecting Histamine and Tyramine Formation in Turkish White Cheese. *Hacettepe Hacettepe Journal of biology and chemistry*. 36 (3), 197-206.
7. Instituto Español de Comercio Exterior. ICEX (2012). El mercado del queso en México. Notas sectoriales.
8. Gutiérrez-Méndez N; Nevarez-Moorillón G. V. (2009). Queso Chihuahua: historia de un queso mexicano. *Carnilac Industrial* 25: (5) 27-33.
9. Joosten H.M.L.J; Stadhouders J. (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. Decarboxylative properties of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J*. 41: 247-258,
10. Maintz L; Novak N. (2007). Histamine and histamine intolerance *The American Journal of Clinical Nutrition*. 85-5 1185-1196.
11. McCabe-Sellers B; Staggs C; Bogle M. (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis* 19. p 58–65.
12. Olson D; Van Hekken DL; Tunick MH; Tomasula PM; Molina-Corral F; Gardea A. (2011). Mexican Queso Chihuahua: Functional properties of aging cheese. *Journal Dairy Sci*. 94:4292–4299.

13. Ordoñez A; Ibañez F; Torre P; Barcina Y. (1997) Formation of biogenic amines in Adiazábal ewe's milk cheese: effect of ripening, pasteurization, and starter. *Journal of Food Protection* 60 (11): 137 –1375.
14. Renye J; Somkuti G; Van Hekken D; Guerrero Prieto V. (2011). Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *Journal. Dairy Sci.* 94:3311–3315.
15. Russo P; Spano G; Arena M. P; Capozzi V; Grieco F; Beneduece L. (2010). Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food? *Curr Res. Technol. Edu. Top. Appl. Microbiol. Microb.Biotechnol.* 1087–1095.
16. Sathyanarayana Rao T; Yeragani V. (2001). Hypertensive crisis and cheese. *indian journal psychiatry.* 51(1).
17. Tunick M H; Van Hekken D J; Molina-CorraL F J; Tomasula P T; Call J; Luchansky J; Gardea A A. (2008). Queso Chihuahua: manufacturing procedures composition, protein profiles, and microbiology. *International Journal of Dairy Technology.* Vol. 61, p 62-69.
18. Van Hekken D L; Tunick P M; Tomasula F J; Molina V; Gardea A A. (2007). Mexican Queso Chihuahua: Rheology of fresh cheese. *Int. Journal. Dairy Technology.* 60:5–12.
19. Van Hekken D M; Drake F; Molina V; Guerrero P; Gardea A A. (2006). Mexican Chihuahua Cheese: Sensory profiles of Young Cheese. *Journal Dairy Sci.* 89:3729-3738.

## **CAPITULO II**

### **REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

#### **2. Quesos y sus características.**

El queso se define como producto elaborado de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenado, prensado o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales. Este proceso da lugar a las diferentes variedades de quesos que pueden ser frescos, madurados o procesados (Anónimo, 1994a).

El queso es una forma de conservar los principales nutrientes de la leche, la cual pueden ser de diferente origen (vaca, cabra, oveja, búfalo). Las primeras operaciones en la fabricación de queso son la selección y pre-tratamiento de la leche (pasteurización y estandarización) que consiste en el ajuste de la relación de grasa y de la proteína para dar la composición deseada del queso final (Fox *et al.*, 1993).

#### **2.1. Elaboración de quesos**

Las operaciones unitarias fundamentales que tienen lugar durante la fabricación del queso son, coagulación, desuerado, moldeado, prensado y salado. En su elaboración se toman en cuenta diferentes parámetros como son pH, actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura y potencial redox, cada uno de estos parámetros puede emplearse para disminuir o aminorar las reacciones químicas y enzimáticas afectando las características finales del queso y por ende su calidad (Fox *et al.*, 1993).

La coagulación consiste en la gelificación de la leche, la cual se puede conseguir por adición de enzimas como renina o por cultivos iniciadores de bacterias lácticas con lo que se consigue la acidificación más rápida y controlada. En esta parte del proceso la caseína coagula y forma un gel donde queda retenida la grasa. Se prosigue cortando la cuajada y de esa manera se permite la salida del suero (desuerado), en esta parte sucede la sinéresis, consiguiendo la separación de las fases sólida y líquida. En la parte sólida se concentra el contenido de la caseína y de grasa de seis a doce veces del contenido de la leche (Fox *et al.*, 1993). Posterior al desuerado se

prosigue con las etapas de moldeado y prensado de la cuajada, el prensado permite regular la humedad del queso, además se produce una acidificación por la formación de ácido láctico a partir de la lactosa por la microbiota láctica.

Por último, se requiere añadir NaCl (del 2% al 10%) ya sea por salado en seco o por inmersión en salmuera, este compuesto tiene un efecto de conservante, ya que disminuye la actividad del agua, regula la actividad microbiana y enzimática, la adición de sal produce también cambios en el sabor y textura del queso (Guinee y Fox, 2004). Si se pretende elaborar un queso fresco en esta etapa se finaliza el proceso. Los quesos madurados requieren de un proceso adicional que puede requerir desde días, hasta más de 1, año y el proceso es diferente según el tipo de queso.

### ***2.1.1. Quesos en México***

Los quesos en México tienen una fuerte raíz histórica nacional; se elaboran desde tiempos de la Colonia, aunque no se dispone de suficiente información escrita, se considera válida la tradición oral de diferentes informantes como técnicos especializados del área de las diferentes partes del país. Los quesos hasta mediados del siglo pasado, eran elaborados a partir de leche fluida de vaca o de cabra, fundamentalmente cruda, con el empleo mínimo de aditivos como cuajo, sal y eventualmente cloruro de calcio, hasta que se introdujeron nuevas tecnologías y se utiliza leche pasteurizada para asegurar la inocuidad de los productos. Estos quesos son fabricados dentro del territorio nacional por mexicanos, nativos o nacionalizados (menonitas y chipileños) o extranjeros residentes. Muchos de estos quesos son regionales o meramente locales y son la expresión de las condiciones ecológicas y del conocimiento tradicional del territorio donde se elaboran. En el país, existen más de 40 variedades de quesos genuinos, característicos de las diversas regiones del país, algunos gozan de una amplia difusión y tienen prestigio nacional e internacional (Villegas, 2004).

En la tabla 1 se presenta un listado de quesos genuinos mexicanos.

**Tabla 1.** Quesos genuinos de las diversas regiones del país

Queso	Área de producción
Menonita	Chihuahua, Durango
Asadero	Chihuahua, Durango
Ranchero	Centro de Veracruz
De Hoja	Centro de Veracruz
De Rueda	Tlacolutla, Veracruz
Trenzado	Veracruz y Oaxaca
De bola de Ocozingo	Ocozingo, Chiapas
Adobera,	Jalisco, Guanajuato
Cotija,	Michoacán, Chiapas, Tabasco.
Oaxaca	En casi toda la República Mexicana
Sierra	En el Bajío y centro del país.
Guaje de Bola	Huasteca Potosina
Crema tropical	Chiapas y Tabasco
De Poro	Zona de los Ríos de Tabasco
Chongos zamoranos	Michoacán, Estados del centro
Chapingo	Chapingo Estado de México
De sal	Chiapas
De Cincho	Morelos

Fuente: Villegas, 2004.

Algunos quesos solo son consumidos en la región en que se produce, otros se han difundido por todo el país, y algunos incluso otros han llegado al extranjero, principalmente a los Estados Unidos de América, como son el queso cotija, el queso Oaxaca, queso Chihuahua (Villegas y Cervantes, 2011). Los quesos mexicanos genuinos forman parte de la tradición y cultura del país, pero se están extinguiendo ante la presión competitiva que ejercen los productos de imitación, lo que contribuye a una pérdida gradual de nuestras tradiciones alimentarias. En el país, ha aumentado el consumo de los quesos de imitación como el queso imitación panela, imitación Oaxaca, imitación Chihuahua y otros. Algunas razones que han favorecido la difusión y arraigo de estos productos en el mercado nacional es su precio más bajo con relación a los genuinos y también por los nuevos hábitos de consumo que privilegian los productos con grasa vegetal y bajos en colesterol aun a costa de sabor y textura. En este momento no hay una norma que regule a los quesos de imitación o similares, por lo que Villegas y Cervantes, (2011) proponen una clasificación para quesos y productos similares encontrados en México (Tabla 2).

**Tabla 2.** Quesos y productos similares de venta en México

Categoría	Subcategoría
Quesos Genuinos	<ul style="list-style-type: none"><li>• De leche pasteurizada</li><li>• De leche cruda</li></ul>
Quesos de Imitación (o imitación queso)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Quesos rellenos (con grasa vegetal)</li><li>• Quesos extendidos (con grasa vegetal )</li><li>• Quesos recombinados, con grasa butírica y vegetal</li></ul>
Quesos Procesados (o fundidos)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tajables</li><li>• Untables</li></ul>

Fuente: Villegas y Cervantes, 2011

Entre los quesos de imitación están los quesos rellenos, los cuales son elaborados con leche que se le ha sustituido total o parcialmente por grasa vegetal, los quesos extendidos los cuales se elaboran con leche extendida, donde según la FAO, es el producto resultante de combinar grasa de leche y sólidos no grasos de leche, en diferentes formas, con agua este proceso es utilizado para aumentar la capacidad de rendimiento quesero.

En la clasificación anterior, el concepto de quesos procesados se refiere a los quesos con un proceso que modifica las propiedades reológicas que permiten manejar la pasta al consumir el producto y estas propiedades están determinadas por factores que afectan su estructura en gran parte por el contenido de agua y calcio en la pasta (Villegas, 2004).

### **2.1.2. Quesos frescos**

Los quesos frescos son elaborados con leche pasteurizada de vaca (ocasionalmente de cabra) entera o parcialmente descremada, se caracterizan por ser productos de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración (Anónimo, 1994a).

De los quesos se comercializan en todo el país, el queso panela es el de mayor consumo seguido por el queso oaxaca.

El queso panela, también conocido como queso canasta debido a las marcas en su superficie ya que se moldeaba en canastas, contiene un porcentaje de agua de 58%. Es un queso ligero de pasta blanda y fresca, no tiene maduración por lo que debe consumirse antes de 3 semanas. (SAGARPA, 2010).

El queso oaxaca es un queso fresco de pasta hilada conocido también como queso hebra o asadero, con un porcentaje de agua de 50,8% este queso se moldea en forma de correas mediante estiramiento de la cuajada aún caliente y se trenza. Un punto crítico para su elaboración estriba en lograr una pasta con pH entre 5,1 y 5,3 (Domínguez *et al.*, 2011).

Estos quesos, panela y oaxaca son los de mayor consumo en el país, seguido por el queso chihuahua, clasificado como queso maduro (Galván, 2005).

### **2.1.3. Quesos madurados**

Los quesos madurados son aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso, son sometidos a un proceso de maduración mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel. Los quesos madurados se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda y pueden tener o no corteza así como pueden o no requerir condiciones de refrigeración (Anónimo, 1994a).

La maduración del queso es un proceso mediante el cual la cuajada se transforma en una masa homogénea con sabor, aroma y textura característicos. Los cambios bioquímicos que tienen lugar durante la maduración están regulados por el pH,  $a_w$ , concentración de NaCl y la microbiota del queso. Los cambios que se presentan durante este proceso, se agrupan en eventos primarios como glicólisis, lipólisis y proteólisis y en eventos como secundarios: metabolismo del lactato, de los ácidos grasos y de los aminoácidos, así el queso se mantiene en adecuadas condiciones a lo largo de la maduración que puede oscilar desde dos y tres semanas hasta dos años o incluso más tiempo (McSweeney, 2004; Fox, 1993).

Dentro de los quesos madurados se encuentran los quesos cheddar, chester, chihuahua, manchego, brick, edam, gouda, gruyere, emmental, cheshire, holandés, amsterdam, butterkase, cabrales, camembert, roquefort y danablu, entre otros (Revista del consumidor, 2012).



#### 2.1.4. Queso Chihuahua

Desde hace más de 50 años el Estado de Chihuahua en el noreste del país, ha ocupado lugar importante en la industria del queso, principalmente el queso elaborado originalmente por la población de menonitas que viven en ciudad Cuauhtémoc y sus alrededores que sobresale por la producción de queso conocido como queso menonita o queso chihuahua. Es muy probable que este queso tenga como antecesor al queso cheddar inglés, ya que comparte con éste la forma, el peso aproximado, varios pasos del proceso y cierto grado de chedarización de la pasta. Su origen puede establecerse en las comunidades de menonitas que emigraron de Canadá a México hace varias décadas y se establecieron en algunas regiones norteñas del país como Chihuahua y Durango. Actualmente 50000 menonitas habitan en la región de Cuauhtémoc, Chihuahua; los cuales procesan una gran cantidad de queso diariamente en pequeñas y medianas queserías (Tunick *et al.*, 2008).

En la tabla 3 se presenta la distribución del consumo de quesos en México donde el queso chihuahua ocupa un tercer lugar (Galván, 2005). La producción de queso chihuahua en el país en el año 2010 fue de 28,793 toneladas, con un valor de producción de aproximadamente 1,489 millones de pesos (SIAP-SAGARPA, 2010).

**Tabla 3.** Consumo de quesos en México

TIPO DE QUESO	PORCENTAJE
Panela	52,3 %
Oaxaca	17,4 %
Chihuahua	11,5 %
Tipo Manchego (mexicano)	7,6 %
Cotija	4,6 %
Tipo americano	4,2 %
Crema	2,3 %

Fuente: Galván, 2005

Las características típicas del queso chihuahua son las siguientes, el color es amarillo claro, y cuando esta madurado se torna amarillo dorado. Presenta una consistencia semidura y rebanable (Anónimo, 1985; Cervantes *et al.*, 2008). También es comparable sensorialmente

con el queso cheddar de un mes de maduración, pero según estudios reológicos es más parecido al queso colby, queso de origen americano (Van Hekken *et al.*, 2007).

El proceso de elaboración del queso chihuahua no está estandarizado, por lo que el producto de las diferentes queserías comparte ciertas características y presentan rasgos esenciales comunes pero difieren en otros. Es así que, cuando se habla de quesos chihuahua puede tratarse de: 1) queso artesanal, elaborado por los menonitas con leche no pasteurizada; 2) queso industrial, elaborado por menonitas con leche pasteurizada; 3) el queso artesanal elaborado en diferentes regiones del Estado por queseros no menonitas; 4) queso denominado chihuahua elaborado fuera del Estado de Chihuahua; 5) y queso denominado chihuahua importado de otros países.

En México, la calidad de quesos se encuentra regulada por la Secretaría de Salud, institución responsable de la calidad sanitaria de los productos alimenticios elaborados en el país o importados. Esta Secretaría en 1994 publicó la Norma Oficial Mexicana “NOM-121-SSA1-1994”, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.” Esta norma ubica al queso chihuahua en la clasificación de queso maduro prensado. En el estado de Chihuahua se le conoce como queso menonita y en el resto del país se le conoce como queso tipo chihuahua (Anónimo, 1994a).

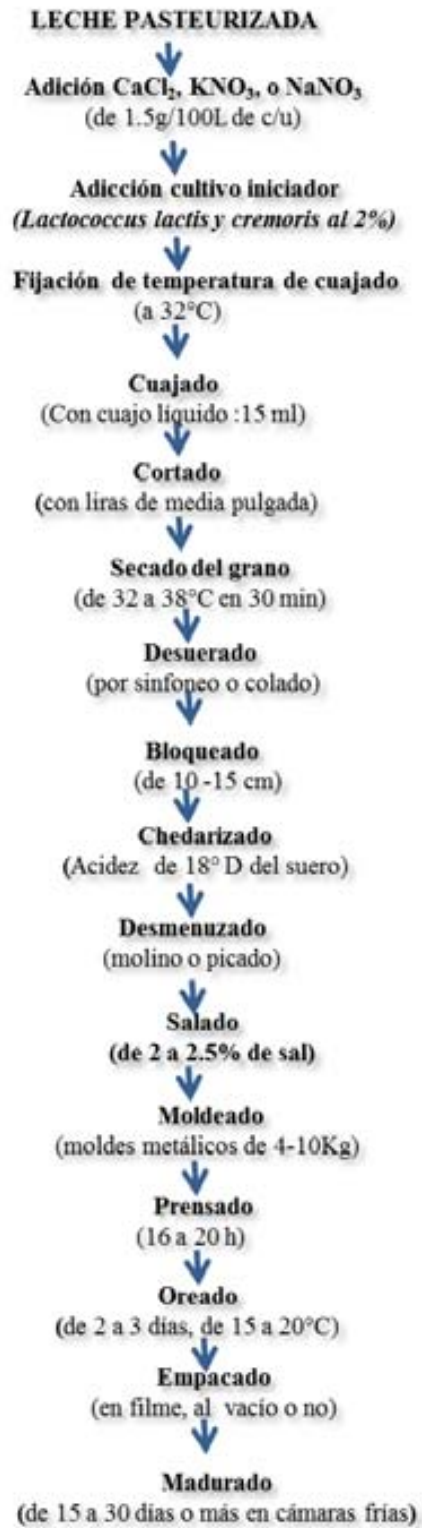
En la tabla 4 se describen las especificaciones de la norma NMX-F-209-1885. Alimentos-Lácteos-Queso Tipo Chihuahua. Esta norma define al queso chihuaua como “Producto obtenido a partir de leche pasteurizada entera de vaca, sometida a procesos de coagulación, corte, desuerado, fermentación, salado, prensado y madurado durante un período mínimo de 7 días a temperatura y humedad controladas; sin que hayan empleado en su elaboración grasas o proteínas no provenientes de la leche” (Anónimo 1985).

**Tabla 4.** Especificaciones físico químicas del queso chihuahua e la Norma NMX-F-209 1985

Parámetros	Mínimo%	Máximo%
Humedad	40-41	45
Grasa butírica	26	*
Proteína	22	*
Sólidos totales	55	*
Cenizas totales	*	6,5
pH	5,0	5,5
NaCl	*	3.0

\*No específica. Fuente: Anónimo, 1985

El proceso de elaboración del queso chihuahua se presenta en la figura 2 donde se describen las condiciones en que se desarrollan las diferentes operaciones unitarias. El proceso de maduración se realiza mediante la adición de microorganismos *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris* bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad. Se fabrica en forma de rectángulos de unos 10 Kg los cuales después de su maduración se cortan en barras de 2,5 Kg aproximadamente.



**Figura 2.** Esquema de la manufactura de quesos Chihuahua

Fuente: Adaptado de Villegas, (2004)

## **2.2. Microorganismos en los quesos**

Los microorganismos son componentes esenciales de los diferentes tipos de quesos y juegan un papel importante durante la fabricación y maduración del queso. Se pueden distinguir dos grupos principales, la flora utilizada como iniciadora y la flora secundaria. Estos microorganismos pueden utilizarse en forma individual o en diversas combinaciones dependiendo de la variedad de queso. Durante la maduración del queso la flora utilizada como iniciadora es la responsable de la formación de ácido, y la flora secundaria produce una serie de reacciones bioquímicas las cuales son responsables para el desarrollo de sabor y textura que se requiere. En muchas variedades de queso, la acción de la flora secundaria contribuye significativamente a las características específicas de cada tipo de queso (Beresford *et al.*, 2001).

### **2.2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)**

El género *Lactobacillus* es el grupo más grande y heterogéneo dentro de las bacterias lácticas, comparten varias características como son bajo contenido de G + C (<55% en moles), alta tolerancia al ácido, no forman esporas, son aerotolerantes, pero no aeróbicas, con requerimientos nutricionales muy exigentes, catalasa negativa y productores de ácido láctico como principal producto de la fermentación (Jeffery *et al.*, 2005; Madigan y Martiniko, 2006). Se desarrollan en condiciones de anaerobiosis o con baja presión de oxígeno y con un pequeño porcentaje de dióxido de carbono (De Vuyst, 2000). Los diversos géneros de bacterias ácido lácticas se han definido sobre la base de su morfología celular, ADN y tipo de fermentación. Según el metabolismo de los carbohidratos las bacterias lácticas se dividen en dos grupos principales de especies según la naturaleza y la concentración de los productos finales resultantes de la fermentación de la glucosa: homofermentativas y heterofermentativas (facultativos y obligados) (tabla 5). En el grupo de las bacterias lácticas homofermentativas principalmente se encuentran los *Streptococcus* (*S. mutans*, *S. thermophilus*), *Enterococcus* (*E. faecalis*), *Lactococcus* (*Lc. lactis subsp. lactis*), *Pediococcus* (*P. pentosaceus*, *P. halophilus*) y *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*) son microorganismos que utilizan la vía de Embden-Meyerhoff y su producto final es exclusivamente ácido láctico. Las bacterias lácticas heterofermentativas fermentan la glucosa y producen ácido láctico, además etanol y CO<sub>2</sub>.

Utilizan la vía de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa para generar energía. Los grupos principales que pertenecen a esta clase son los *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Ray y Bhunia, 2008).

Los miembros del género *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, tienen un alto porcentaje de homología en el ADN, existiendo muy poca variación de un género a otro. El género *Lactobacillus* es diferente ya que posee especies con composición de bases de ADN muy diversa y presentan un metabolismo diferente por lo que no se considera un grupo homogéneo (Madigan y Martiniko, 2006; Curry y Crow, 2003).

**Tabla 5.** Principales especies de *Lactobacillus* y tipo de fermentación

Homofermentativos	Heterofermentativos	
	Facultativos	Obligados
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. bifementans</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. coryneformis</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrueckii subsp delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. delbrueckii subsp lactis</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. delbrueckii subsp bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. kefir</i>
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. reuteri</i>

Fuente: Curry y Crow, 2003

En relación a su crecimiento, las colonias del genero *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Estos microorganismos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados por esta razón son utilizados en los cultivos iniciadores (Law y Kolstad, 1983).

### 2.2.1.1. Cultivos iniciadores

La industria láctea en la elaboración de productos fermentados como queso, requesón, mantequilla, kefir, yogur utilizan cultivos iniciadores, los microorganismo que más se utilizan son las bacterias lácticas (BAL) teniendo como función la de fermentar la glucosa,

transformándola en ácido láctico. Su principal característica es que causan una disminución del pH lo que inhibe el crecimiento de otros microorganismos en el alimento fermentado y propiciando la coagulación de la caseína (Parra, 2010).

Los cultivos iniciadores crecen desde el comienzo de la coagulación, hasta alcanzar rápidamente densidades celulares muy altas en las primeras horas de fermentación ( $10^8$ - $10^9$ UFC/mL). Posteriormente hay una disminución gradual a lo largo de la maduración del queso. Los cultivos lácticos desarrollan un papel principal en el inicio de la fermentación, produciendo acidez, favoreciendo la coagulación y promoviendo la maduración de los quesos (Ross *et al.*, 2000). Aunque los cultivos iniciadores pueden estar constituidos por diferentes tipos de microorganismos, las bacterias que generalmente se emplean para la fermentación son de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* en el caso de los cultivos mesófilos (crecimiento óptimo a 30-37°C) y *Streptococcus thermophilus* y especies termófilas de *Lactobacillus* como *L. delbrueckii* o *L. helveticus* en el caso de los cultivos termófilos (crecimiento óptimo a 42°C) (Beresford *et al.*, 2001).

Las BAL son responsables además de la producción de ácido láctico y algunas de ellas participan en la producción de aroma y CO<sub>2</sub>, a partir de citrato se forman principalmente compuestos como el acetaldehído y la acetoína. Los cultivos iniciadores participan también en la proteólisis donde actúan hidrolizando las cadenas polipeptídicas liberando aminoácidos estos últimos sirven como precursores para la formación de compuestos volátiles responsables en gran parte de las propiedades organolépticas del queso (Gerrit *et al.*, 2005).

Los aminoácidos producidos son catabolizados por una vía inicial, en la que actúa una enzima amino transferasa, y dos vías catabólicas donde se presenta una desaminación o una descarboxilación. La desaminación, genera productos aromáticos debido a la acción de deshidrogenasas ( $\alpha$ -cetoácido y amoníaco) o de oxidasas (aldehído y amoníaco). Por otro lado, la descarboxilación de los aminoácidos ha sido muy estudiada, debido a la producción de aminas biógenas, algunas de las cuales pueden causar efectos fisiológicos adversos en consumidores susceptibles (McSweeney, 2004; Silla-Santos, 1996; Fox, 1989; Ramos-Izquierdo *et al.*, 2009).

### **2.2.1.2. Bacterias lácticas no integrantes del cultivo iniciador (NSLAB)**

La leche es una importante fuente de BAL, estos microorganismos son diferentes de acuerdo a la alimentación del ganado y al entorno en que se desarrollan. La pasteurización de la leche disminuye el contenido de estas bacterias (Ramos-Izquierdo *et al.*, 2009). Las bacterias autóctonas o nativas de la leche no integrantes del cultivo iniciador, tienen una marcada influencia en el desarrollo del sabor, aroma y textura de los quesos y por tanto, en su calidad (Sheehan *et al.*, 2008). Las NSLAB en el queso, producen un incremento en los niveles de aminoácidos libres y pueden intensificar el sabor, pero también pueden tener efectos negativos ya que se les asocia con algunos defectos de los quesos como la formación de cristales de D-lactato de calcio como consecuencia de su capacidad para racemizar el L-lactato a D-lactato y también pueden ser responsables de la aparición de compuestos que producen sabores u olores desagradables no característicos del queso (Milesi, 2008).

### **2.2.2. Microorganismos en quesos que afectan la salud**

La inocuidad de los productos lácteos es un requisito que deben cumplir todos los fabricantes y estos se encuentran en las normativas de los diferentes países. El queso es uno de los productos que se ha relacionado con bacterias patógenas principalmente *Salmonella*, *Listeria*, *Echerichia coli* y *Staphylococcus aureus* estos microorganismos representan un peligro para la salud de los consumidores. (Van Cauteren *et al.*, 2009; Briton *et al.*, 2008; Najand y; Ghanbarpour, 2006; Linnan *et al.*, 1988; Ratnam y March, 1986; Fantasía *et al.*, 1975).

La presencia de coliformes en el queso son importantes porque tienen relación con la *E coli* microorganismo indicador de contaminación fecal y además por su relación con cepas enteropatógena, por lo que diferentes investigadores sugieren realizar el estudio de los diferentes serotipos (Najand y; Ghanbarpour, 2006). Otro de los microorganismo relacionado con productos lácteos es la *Listeria* específicamente la *L. monocytogenes* identificada como cepa virulenta que causa listeriosis, siendo la población más vulnerable mujeres embarazadas, recién nacidos, adultos mayores y personas inmunocomprometidas (Yde *et al.*, 2010).

Brito y col (2008) reportaron *L. monocytogenes* en quesos elaborados con leche pasteurizada donde la fuente de contaminación fueron los refrigeradores de almacenamiento. Además, el personal que participa en la elaboración pueden contribuir en la contaminación con bacterias como el *Staphylococcus aureus* (Callon *et al.*, 2008).



Otros riesgos que afectan la salud de los consumidores de productos lácteos son las bacterias con enzima amino descarboxilasa donde se ha identificado diferentes cepas de microorganismo tanto Gram positivos como Gram negativos (Marcobal *et al.*, 2006; Izquierdo *et al.*, 2003; Roig-Sagués *et al.*, 2002; Marino *et al.*, 2000; Silla-Santos, 1996).

### **2.3.-Aminas Biógenas**

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular sintetizadas por el metabolismo endógeno o el metabolismo de microorganismos presentes en alimentos vegetales y animales. Se forman como resultado de un proceso metabólico, por contaminación microbiana o por bacterias utilizadas para la fermentación de diferentes alimentos, debido principalmente a la presencia de bacterias con enzimas amino ácido descarboxilasas en alimentos que contienen aminoácidos libres, principalmente a temperaturas superiores a 19°C (aunque pueden producirse a temperaturas de refrigeración) dependiendo del tiempo de almacenaje (Bover-Cid *et al.*, 2001; Bozkurt y Erkmen, 2004; Izquierdo *et al.*, 2006).

Los aminoácidos histidina, tirosina, triptófano y fenilalanina, por la acción de las enzimas descarboxilasas, forman las monoaminas histamina, tiramina, triptamina y 2 feniletilamina respectivamente, y las diaminas putrescina y cadaverina son formadas a partir de ornitina y lisina respectivamente. Una vía alternativa para la síntesis de putrescina requiere la arginina descarboxilasa donde el sustrato es la arginina (Viña y Viña, 1994). Para la producción de espermina y espermidina primero se forma la putrescina por descarboxilación de L-ornitina, se condensa un grupo amino propilo a la putrescina, por la acción de la ornitina descarboxilasa dando espermina, al unirse otro grupo de amino propilo da lugar a la espermidina (Smela *et al.*, 2003). En la tabla 6 se presentan los aminoácidos y su correspondiente amina biógena generado por la remoción del grupo  $\alpha$  carboxilo así como a acción primaria desarrollada en organismo humano.

**Tabla 6.-**Productos de la descarboxilación de aminoácidos

AMINO ÁCIDO LIBRE	AMINA PRODUCIDA	ACCIÓN PRIMARIA
Histidina	Histamina	Vasoconstricción
Arginina	Putresina	√
Lisina	Cadaverina	√
Ornitina	Putresina	√
Fenilalanina	Feniletilamina	Vasodilatación
Tirosina	Tiramina	√
Triptófano	Triptamina	√

Fuente: McCabe-Sellers *et al.*, (2006)

Las aminas biógenas se puede encontrar en alimentos crudos de origen vegetales como plátano, tomate, espinacas, fruta seca. También se pueden desarrollar en alimentos que se deterioran fácilmente por acción de los microorganismos y que contienen sangre o vísceras, como la carne y el pescado principalmente. Así mismo, han sido detectadas en alimentos fermentados como productos cárnicos y lácteos fermentados, bebidas alcohólicas no destiladas como cerveza y vinos, y en productos de vegetales como col fermentada, salsa de soja entre otros (Suzzi y Gardini, 2003; Eerola *et al.*, 1993; Stratton *et al.*, 1991; Ordoñez *et al.*, 1997; Onal, 2007).

Se considera que la presencia de histamina, putrescina y cadaverina se debe a microorganismos presentes por contaminación microbiana, mientras que la tiramina está más relacionada con las bacterias responsables de la elaboración de determinados productos fermentados. En alimentos madurados o fermentados (productos cárnicos, quesos, vino y cerveza), el origen de las aminas biógenas puede ser doble, ya que se puede deber a una mala calidad higiénica de las materias primas, pero también a la actividad de microorganismos implicados en los procesos de maduración o fermentación (La Gioia *et al.*, 2011; Izquierdo *et al.*, 2006).

### **2.3.1. Enzimas descarboxilasas**

La expresión de la actividad de las enzimas descarboxilasas depende del potencial genético, así como de otros factores como el pH del alimento (ligeramente ácido), disponibilidad de aminoácidos libres, presencia de carbohidratos fermentables (glucosa), presencia de fosfato de piridoxal (cofactor de la reacción de descarboxilación) temperaturas de maduración, actividad

del agua, baja concentración de sal, los cuales favorece la acción de las bacterias con enzima amino descarboxilasa (Aliakbarlu *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2007; Pinho *et al.*, 2004; Maijala, 1993).

Aunque las temperaturas superiores a los 15°C favorecen el desarrollo de los microorganismos y por ende de las aminas biógenas se ha reportado actividad de la enzima amino descarboxilasa a temperaturas de 4°C (Standarová *et al.*, 2010; Lavizzari *et al.*, 2007; Mariné i Font, 2005; Arena y Manca de Nadra., 2001).

### **2.3.2. Microorganismo con enzima aminoácido descarboxilasa**

Una gran variedad de especies del genero *Lactobacillus* poseen enzimas amino descarboxilasa. Las especies que han sido reportadas como productores de aminas biógenas son: *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* (Izquierdo *et al.*, 2003). Se han identificados también microorganismos de otros géneros que son productores de aminas biógenas en alimentos, como algunas especies de los géneros, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Morganella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Edwardisiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus* (Silla-Santos, 1996).

### **2.3.3. Enzimas del organismo humano que degradan aminas biógenas**

Las concentraciones de aminas biógenas en los alimentos, no suponen un riesgo para la salud para la mayoría de los consumidor, ya que el sistema digestivo del organismo humano posee un eficiente mecanismo para eliminar estas moléculas a través de las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y la diaminoxidasa (DAO). Estas enzimas transforman las aminas en metabolitos no tóxicos en el intestino para ser eliminados antes de entrar al sistema circulatorio. Sin embargo, en individuos con deficiencia o inhibición de estas enzimas, puede existir cierto riesgo de reacciones adversas (Izquierdo *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 1996). Por esta razón diferentes investigadores han reportado intoxicaciones por aminas biógenas en diferentes alimentos (Eerola *et al.*, 1993; Stratton *et al.*, 1991; Taylor, 1985).

En el metabolismo humano la monoamino oxidasa (MAO) CE 1.4.3.4 y la diamino oxidasa (DAO) EC 1.4.3.6 son las enzimas encargadas de catabolizar las aminas biógenas que ingerimos a través de los alimentos en condiciones normales. El procesos de desintoxicación puede verse alterado cuando la ingesta de aminas biógenas es muy elevada o en personas

especialmente sensibles donde estas enzimas no son funcionales como sucede en patologías del sistema gastrointestinal (gastritis, síndrome de colon irritable, enfermedad de Crohn o úlceras gástricas) o bien por problemas genéticos, donde se encuentra alterado el gen que codifica para estas enzimas. Existen además sustancias que pueden inhibir estas enzimas, como el alcohol, algunos fármacos como son los antihistamínicos, medicamentos contra la malaria, enfermedad de parkinson o antidepresivos (Maintz y Novak, 2007; Karovicova y Kohajdova, 2005; Livingston y Livingston, 1996).

Por ello, los individuos que toman medicamentos inhibidores de la MAO o que por causas genéticas son incapaces de producirlas, tienen menor capacidad de destoxificar las moléculas de aminas biógenas y tienen mayores riesgos de padecer trastornos si consumen alimentos que contienen histamina o tiramina (quesos, vino, cerveza, pasas, higos envasados, bananas, etc.), por lo tanto, tendrán efectos perjudiciales para la salud (Haláz *et al.*, 1994; Stratton *et al.*, 1991).

#### ***2.3.4. Principales aminas biógenas y su efecto en la salud.***

Uno de los primeros reportes documentados causados por aminas biógenas fue de los médicos Legroux y Bouet en 1946, quienes identificaron la intoxicación por histamina en dos pacientes que habían consumido atún transportado en forma inadecuada, por esta razón, estas intoxicaciones se relacionaron por mucho tiempo solo con pescados en mal estado, especialmente en peces de la familia de los escombridos (Marine Font, 2005).

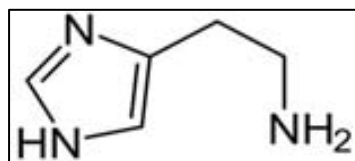
Otra amina biógena, la tiramina se ha relacionado con crisis hipertensivas en determinados pacientes, Horwitz y col, (1964), publicaron los efectos tóxicos intensos como hipertensión de un paciente que se le administró un antidepresivo (tranilcipromina) el cual es un inhibidor de la mono amino oxidasa (IMAO). Posteriormente se identificó que esta amina se encontraba en algunos quesos por lo que se llamó “reacción por quesos”. Más tarde otros investigadores han reportado diferentes aminas presentes en los alimentos que pueden causar efectos tóxicos e interactuar con medicamentos (Finberg y Gillman, 2011; López y Alamo, 2007; Lavizzari *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 1999).

Existe poca información de la frecuencia de intoxicación por histamina o alguna otra amina biógena, por no existir una regulación específica sobre estas sustancias. En los pacientes que ingresan a urgencias por intoxicación alimentaria, el diagnóstico no busca relación con la

ingesta de aminas biógenas. Por otra parte las investigaciones realizadas en los diferentes alimentos muestran que una amina nunca se encuentra sola, sino que se ha detectado la presencia de otras aminas como tiramina, cadaverina, putrescina, entre otras, lo cual puede potenciar su toxicidad (Ladero *et al.* , 2010; Marine Font, 2005).

#### 2.3.4.1. Histamina

La histamina o  $\beta$ -aminoetilimidazol, es una amina heterocíclica, hidrófila y termoestable compuesta de un anillo imidazol y un grupo amino unidos por dos grupos metileno (figura 3), se forma por la descarboxilación de la histidina, reacción catalizada por la histidina descarboxilasa (Landete, 2005; Fernández, 2001).



**Figura 3.-** Estructura química de la histamina

La amina más estudiada es la histamina, y la intoxicación por histamina es la más conocida, existiendo referencias desde finales del siglo XIX sobre la incidencia de esta enfermedad, conocida como enfermedad escombroides debido a que los trastornos tenían lugar tras la ingestión de pescados de la Familia Scombroidae, entre los que se encuentran el atún y la macarela o caballa. La histamina además se ha detectado en vinos, cerveza, quesos, salchichas (Fernández *et al.*, 2001; Morrow *et al.*, 1991).

En quesos fermentados se han reportado la presencia de una gran variedad de bacterias con la enzima histidina descarboxilasa, Edwards y Sandine en 1981 aislaron en queso suizo *Streptococcus mitis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* y *Propionibacterium* y los identificaron como microorganismos productores de histamina. Más tarde Summer en 1985 identificó en queso suizo una cepa de *Lactobacillus buchneri* productora de histamina. Stratton y col (1992) aislaron varias especies productoras de histamina identificadas como *L. fermentum*, *L. helveticus*, *Enterococcus faecium*, *L. lactis subsp. lactis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, y *L. arabinosa*.

En el organismo humano los valores de referencia para la histamina en plasma en sujetos sanos fluctúan de 0,3 a 1,0 ng/mL (Maintz y Novak., 2007). Esta molécula en el organismo

actúa sobre el aparato cardiovascular, músculo liso y glándulas endocrinas. La ingesta de altas concentraciones de histamina da lugar a una intoxicación dando síntomas como dolor de cabeza, náuseas, vómito, diarrea, dolores abdominales, vasodilatación y taquicardia (Valle Vega., 2006; Maintz y Novak., 2007).

Los síntomas por intoxicación con histamina también llamada escombrositis se presentan con erupciones en piel, urticaria eritema en cara, cuello y tronco. Se detectan también manifestaciones del sistema digestivo como náuseas, vómito, diarrea, dolor epigástrico además de hipotensión, edema, taquicardia y cefalea. Algunos pacientes presentan también problemas respiratorios. Los síntomas aparecen desde unos pocos minutos a tres horas de ingestión del producto contaminado y la duración depende, en gran parte, de la condición fisiológica del paciente, llegándose a restablecerse en horas o varios días, esto depende de las concentraciones de histamina y otras aminas que pueden encontrar en alimentos (Anta *et al.*, 2001).

En el ser humano se conocen dos vías importantes del catabolismo de la histamina, la más común incluye la metilación del anillo y es catalizada por la enzima histamina-N-metiltransferasa (Hirata *et al.*, 1999), gran parte de la N-metilhistamina producida es transformada posteriormente por la monoaminoxidasa (MAO) a ácido N-metilimidazol acético; dicha reacción puede ser bloqueada por los inhibidores de la MAO (Bieck y Antonin, 1993).

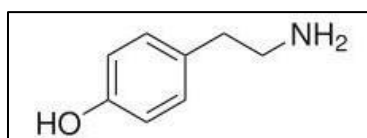
Los niveles máximos permitidos de histamina varían entre los diferentes países y el tipo de alimento en que se investigue. En los Estados Unidos la FDA (Food and Drug Administration) en 1997 estableció niveles máximos de 50 ppm para la prevención de la intoxicación por escombrotóxina. En Alemania, los máximos permisibles para aminas biógenas en pescado y sus productos es de 200mg/kg mientras que en Canadá, Finlandia y Suiza son de 100 mg/kg. La Unión Europea ha establecido la regulación para los niveles de histamina de 100 mg/kg en pescado crudo y por debajo de 200mg/ kg en pescado de maduración enzimática para especies pertenecientes a la familia de *Scombridae* y *Clupeidae* (Yongin, *et al.*, 2007). En México, la Norma Oficial Mexicana (Anónimo., 1993) relacionada con productos de la pesca y pescados en conserva establece los límites máximos de aminas biógenas de 200mg/kg en pescado. No existe ninguna regulación de los niveles de histamina en productos lácteos fermentados.

Investigadores como Karovikova y Kohajdova en 2005 reportan que ingestas de histamina de 5-10mg puede ser considerado como riesgo para personas sensibles, de 10mg es considerado como límite tolerable, la ingesta de 100mg producen una intoxicación media y cantidades de 1000 mg o más producen una intoxicación alta.

En lo relacionado al queso fermentado, son varios factores que favorecen la producción de histamina, como es la presencia del aminoácido precursor, la presencia de bacterias con la enzima amino descarboxilasa, el pH, la concentración de NaCl, el tiempo de maduración, la temperatura de almacenaje y la actividad de agua. A pesar de no haber límites legales en relación a las aminas biógenas, los diferentes investigadores siguieron en la necesidad de reducir su concentración en los alimentos (Russo *et al.*, 2010; Ekici *et al.*, 2004).

#### 2.3.4.2. Tiramina

La tiramina es una monoamina aromática, tiene un grupo benceno que posee un radical nitrogenado y un grupo hidroxilo en posición 3 (fig. 4). Es una de las aminas biógenas más frecuentemente encontrada en diferentes alimentos fermentados relacionada con bacterias ácido lácticas que se utilizan en la preparación de los mismos.



**Figura 4.-** Estructura química de la tiramina

La producción de tiramina no es totalmente atribuible a bacterias lácticas contaminantes, ya que la micro flora fermentativa espontánea propia de los alimentos también está implicada en esta producción. La influencia de la fermentación es evidente en los derivados cárnicos, ya que en los productos cocidos no fermentados los contenidos de aminas normalmente son muy bajos, sin embargo, en algunos casos se han encontrado en estos productos niveles significativos de tiramina y de otras aminas biógenas (histamina, cadaverina y/o putrescina), lo que seguramente indica que la materia prima no tenía las condiciones higiénicas requeridas. Entre las bacterias que tienen actividad tirosina descarboxilasa se encuentran diferentes géneros como *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* o *Carnobacterium* (Bonetta *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2002).

La “reacción al queso” es una consecuencia directa de la inhibición de la MAO (Rang y Dale, 2008). La tiramina requiere de esta enzima para ser metabolizada, en el organismo se encuentra localizada en la pared intestinal y en el hígado tiene la función de evitar la entrada de tiramina a la circulación, cuando la MAO es inhibida, la tiramina entra a la circulación y aumenta su efecto simpaticomimético y la liberación de noradrenalina, que a su vez estimula la producción de histamina y de prostaglandinas, moléculas que actúan como mediadores de la inflamación (Bodmer *et al.*, 1999).

Los síntomas de toxicidad por tiramina son, hipertensión arterial aguda, lo que provoca una cefalea palpitante, fiebre, vómitos (Yongjin *et al.*, 2007; Livingston y Livingston, 1996). En personas sensibles o que presentan inhibición de la monoamino oxidasa (MAO) se considera que 6mg/Kg de tiramina son tóxicos (Ruiz-Capillas y Jiménez-Colmenero 2004).

### **2.3.5. Aminas biógenas en quesos**

Las aminas que se han reportado en mayor concentración en quesos son histamina, tiramina, cadaverina y putrescina (Shirone *et al.*, 2011; Stratton *et al.*, 1991; Silla Santos, 1996).

Las concentración de aminas biógenas en el quesos difiere entre los tipos y variedades de quesos. Los factores que más influyen en su formación son el tipo de leche y el tratamiento de la misma (cruda o pasteurizado), cultivos iniciadores, temperatura y tiempo de maduración y de almacenamiento (Stratton *et al.*, 1991; Pinho *et al.*, 2004; Novella-Rodríguez *et al.*, 2003). Otro factor que participan en la formación de aminas es el pH el cual puede tener un efecto significativo. Un pH de 5,0 es óptimo para la actividad de las enzimas tirosina e histidina descarboxilasa (Díaz-Cinco *et al.*, 1992).

Contreras y col (2007) ha reportado cepas iniciadoras utilizados para la elaboración de quesos madurados que poseen las enzimas amino descarboxilasas. Además de los factores antes mencionados otros factores para las enzimas aminas biógenas en los quesos fermentados, son las condiciones higiénicas, la proteólisis que se produce durante la maduración favoreciendo la liberación de los aminoácidos sustrato para las bacterias con enzima amino descarboxilasa (Fernández *et al.*, 2007; Ordoñez *et al.*, 1997).



### **2.3.6. Prevención de la producción de aminas biógenas en alimentos**

El estudio de las aminas biógenas, tanto en las materias primas como en los productos intermedios de la cadena de procesamiento y en los productos terminados, proporciona una información adicional interesante que ayuda a valorar mejor el estado microbiológico y sanitario de los alimentos.

La inocuidad de los alimentos constituye una de las preocupaciones básicas para la industria de alimentos fermentados, al afectar directamente a la salud de los consumidores ya que la histamina y tiramina son considerados como las aminas más tóxicas. Algunas de las formas de reducir el riesgo de que se presenten estas aminas biógenas en quesos, es tener un control de los diferentes factores que aumentan el riesgo de su producción como: temperatura, humedad, tiempo de maduración, tipo de cultivo iniciador utilizado, y además tener en cuenta las condiciones de postproducción como envasado, transporte y almacenamiento (Vale y Gloria, 1998). En todos los casos se puede demostrar que la buena calidad de las materias primas y el higiénico procesamiento son factores críticos para controlar y reducir la acumulación de aminas biógenas.

### **2.4. Métodos para investigación de aminas biógenas y los microorganismos productores.**

Durante los últimos años, diferentes métodos se han utilizado para la identificación de aminas biógenas en alimentos, los más utilizados son los métodos cromatográficos, como la cromatografía en capa fina (TLC) (García-Maruno *et al.*, 2005) con la limitante de no medir concentración con precisión. Por lo que se utilizaron otras técnicas de cromatografía donde separan y cuantifican las aminas, como la cromatografía de gases (GC), (Fernandes y Ferreira, 2000) la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la ultra cromatografía (UHPLC) (Fernández *et al.*, 2007, Latorre-Moratalla *et al.*, 2009). También se utilizan otras técnicas como la electroforesis capilar (Lange *et al.*, 2002), radioinmunoensayo o los métodos enzimáticos como la ELISA (Enzyme –Linked immunosorbent assay) (Aygün *et al.*, 1999) el cual es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático.

También se utilizan métodos microbiológicos para investigación cualitativa de producción de aminas biógenas y para la identificación de bacterias que las producen, estos métodos son específicos para detectar cepas con la enzima amino descarboxilasa, y utilizan medios de

cultivo selectivos donde se le agrega el aminoácido precursor de la amina biógena a identificar y un indicador de pH (Roig-Sagués *et al.*, 1997; Maijala, 1993; Niven *et al.*, 1981). Otros métodos son los moleculares que se basan en el diseño y utilización de oligonucleótidos específicos para identificar el gen o genes que codifican para la enzima amino descarboxilasa responsables de la formación de aminas biogenas (Landete, 2005).

#### **2.4.1. Método específico para identificar bacterias con enzima amino descarboxilasa**

Se han descrito diversos métodos microbiológicos cualitativos para detectar microorganismos productores presentes en los alimentos. Estos medios se basan en la respuesta del indicador de pH, cuando se produce la amina biógena a identificar se presenta una elevación del pH del medio de cultivo, lo que indica la formación de la amina correspondiente (Marcobal *et al.*, 2006). Este medio de cultivo se ha utilizado para la detección de bacterias con la enzima amino descarboxilasa presentes en alimentos.

Aunque el indicador más utilizado es el púrpura de bromocresol, se han probado otros indicadores del pH, como son el verde bromocresol, rojo de clorofenol y combinaciones de ambos. Algunas modificaciones a este medio fueron reportadas por Joosten y Northold (1989) quienes para adaptar el método a diferentes propósitos agregaron al medio de cultivo sulfatos metálicos (Mg, Mn, Fe) y glucosa, ajustándolo a un pH de 5,0 para favorecer el crecimiento de *Lactobacillus* aislados de queso. Con estas modificaciones se detectó mejor el contraste del color que rodea a las colonias de bacterias. También encontraron que la concentración óptima de glucosa es de 0.1%, ya que las altas concentraciones de glucosa generan una excesiva producción de ácido láctico, lo que provoca la neutralización de la coloración púrpura.

Estos métodos microbiológicos específicos tienen las ventajas de ser sencillos y se requieren pequeñas cantidades de reactivos.

#### **2.4.2. Métodos cromatográficos: identificación y cuantificación de aminas biógenas.**

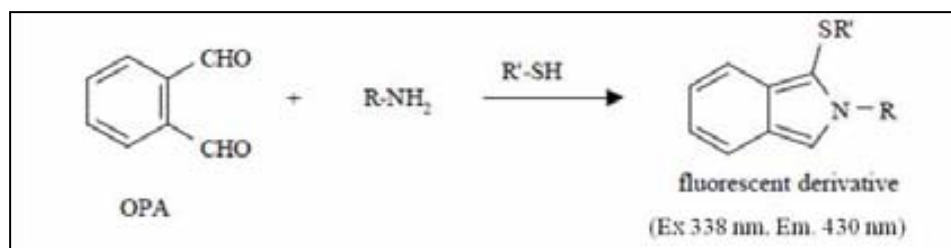
Los métodos cromatográficos se utilizan para separar compuestos orgánicos dentro de una muestra, para su posterior identificación y/o cuantificación. Existen múltiples métodos cromatográficos que son utilizados en la detección y cuantificación de aminas biógenas como son la cromatografía de gases (CG) cromatografía en capa fina (TLC) cromatografía de

intercambio iónico, (C II) cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la última cromatografía de alta resolución (UHPLC) y electroforesis de intercambio iónico.

Siendo la HPLC una de las técnicas más utilizadas para su cuantificación en alimentos (Mazzucco *et al.*, 2010; Onal, 2007; Alberto *et al.*, 2004; Eerola *et al.*, 1993). La determinación de aminas biógenas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se basa en métodos de detección UV y/o, de fluorescencia para la cual se realiza un proceso de derivatización mediante el uso de reactivos como cloruro de dansilo (DNS-Cl); orto-ftaldehído (OPA); 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl); 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), entre otros (Mohamed *et al.*, 2013; Lorencova *et al.*, 2012; Mazzucco *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2010; Onal, 2007; Petridis y Steinhart, 1995).

En la figura 5 se observa el compuesto formado en la derivatización de una amina con el reactivo de OPA, el cual emite fluorescencia y puede ser detectado por una lámpara de fluorescencia o UV. Este método ha sido utilizado por otros investigadores (Yongjin *et al.*, 2007; Alberto *et al.*, 2004; Smela *et al.*, 2003).

En México la normatividad vigente no ha sido modificada en 20 años, pero la NOM-028-SSA1-1993 establece que el método para determinar histamina en pescado en conserva es la cromatografía de capa fina (Anónimo, 1993).



**Figura 5.** Reacción de derivatización de OPA

Para la determinación de las aminas biógenas en alimentos por cromatografía líquida de alta resolución se requiere primero realizar la extracción de las aminas que se quiere cuantificar, a partir de la matriz del alimento, para lograr una total extracción se han utilizado diferentes solventes dependiendo del tipo de alimento. En productos cárnicos y quesos los solventes más utilizados son el ácido clorhídrico, el ácido tricloroacético y el perclórico (Mohamed *et al.*, 2013; Elsanhoty *et al.* 2009; Leszczyńska *et al.*, 2004). Para la extracción de histamina en pescado el metanol es el solvente más utilizado (Smela *et al.*, 2003).

### ***2.4.3. Métodos moleculares para la detección de genes que codifican para enzimas amino descarboxilasas.***

Las bacterias con enzimas amino descarboxilasas son capaces de producir aminas biógenas a partir de sus aminoácidos precursores, por lo que se han desarrollado métodos moleculares para detectar los genes que codifican estas enzimas descarboxilasas en alimentos.

La investigación de los genes que codifican para las enzimas amino descarboxilasa, puede realizarse por la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) donde se detecta la presencia de un gen (en forma cualitativa) o en forma cuantitativa por la PCR tiempo real (rtPCR). También se puede realizar una PCR multiplex para detectar la presencia de varios genes. Estos métodos moleculares, además de ser específicos, tienen la ventaja de identificar la presencia de bacterias productoras de aminas biógenas antes de que se sinteticen.

#### ***2.4.3.1.-Extracción de ADN bacteriano.***

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es de gran utilidad para detectar genes bacterianos con actividad de la enzima amino descarboxilasa, el analito para esta reacción es el ADN de las bacterias por lo que el primer paso es la extracción y purificación del ADN de las muestras, esta puede ser directa (extracción del ADN total de la muestra) o indirecta (aislamiento de los microorganismos de la muestra, seguida de la extracción de ADN de éstos). Para la extracción del ADN de una bacteria, se requiere realizar un cultivo en un caldo de enriquecimiento, que permita la reparación de las bacterias y su multiplicación hasta un número suficientemente elevado, preferentemente los microorganismos debe estar en fase de crecimiento exponencial.

Existen varios protocolos de extracción de ADN, todos los métodos de extracción tienen como finalidad romper la pared celular de las bacterias, eliminar la fracción proteica y enzimas que hidrolizan el ADN.

Para la lisis de la pared celular, se requiere incubar la suspensión celular con detergentes y/o enzimas líticas, posteriormente se debe separar del ADN las proteínas, para ello generalmente se utilizan enzimas que degradan proteínas como la proteinasa K, y se eliminan las proteínas parcialmente degradadas por su disolución con disolventes orgánicos, como fenol/cloroformo, o bien se pasa la mezcla por una columna que retenga el ADN. Este se precipita posteriormente con etanol. Para preservar el ADN extraído se deja en una solución tamponada

que conservan el ADN (-20°C) en forma estable hasta por varios años (González de Buitrago, 2004; Randazzo *et al.*, 2002). Actualmente se comercializan una gran variedad de kits comerciales de biología molecular para la extracción de ADN.

La PCR es un método de síntesis de ADN que fue desarrollado por Kary Mullis en 1983 (Rodríguez y Barrera, 2004). Este método se basa en generar *in vitro* copias idénticas del ADN a partir de una sola molécula. Para esta reacción es necesario preparar una mezcla que contenga el ADN que se desea investigar, agregando oligonucleótidos o iniciadores los cuales son diseñados para ser exactamente complementarios al molde de ADN, además se requiere la enzima Taq polimerasa (enzima termoestable aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*) que tiene la función de formar el ADN nuevo a partir de los oligonucleótidos y los dNTPs (bases nitrogenadas) que son utilizados para extender la nueva cadena de ADN. Esta mezcla requiere una solución tampón que contiene iones magnesio con un pH aproximado de 8,4 el óptimo para que se efectúe la reacción enzimática (Rodríguez y Barrera, 2004).

Esta reacción se inicia calentando la mezcla a 94°C, para la desnaturalización del ADN al romper los enlaces de hidrógeno del ADN, quedando una sola cadena. El siguiente paso es disminuir la temperatura entre 50°C a 60°C, para que los oligonucleótidos se unan a su posición de hibridación (acoplamiento) posteriormente se eleva la temperatura a 72°C que es la óptima para que actúe la enzima Taq-polimerasa para incorporar los dNTPs y formar copias del gen deseado (Brown, 2007).

El método para analizar los productos del proceso de PCR es la electroforesis en gel. Se utilizan geles de agarosa o de poliacrilamida según el tamaño de las secuencias del ADN amplificadas. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable de la carga negativa en condiciones de pH adecuado, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis. Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes, lo cual permite evaluar su integridad y estimar el tamaño de los fragmentos mediante un análisis comparativo con patrones de concentración conocido (marcadores moleculares). El colorante de ácidos nucleicos más utilizado es el bromuro de etidio el cual produce fluorescencia al ser expuesto a la luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989) este

colorante es muy tóxico y mutagénico por lo que en la actualidad existen otros productos comerciales tales como los colorantes SYBR® Green I y II (Molecular Probes Inc, Eugene OR; GelStar™) Bio Whittaker Molecular Applications In.

La forma más empleada para analizar la presencia de un gen bacteriano es obtener los microorganismos de interés en forma aislada y pura para lo cual se emplean medios de cultivo específicos y posteriormente se realiza la extracción del ADN. Esa metodología es la que han seguido (Kalhotka *et al.*, 2012; Bhardwaj *et al.*, 2009; Burdychov *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2006; De las Rivas *et al.*, 2006; Le June *et al.*, 1995) para la identificación de los genes que codifican para la enzimas histidina y tirosina descarboxilasa en quesos.

El aislamiento y cultivo de las cepas representa un paso adicional y la limitante de solo analizar los microorganismos cultivables que no siempre corresponde a la microbiota total de estos quesos fermentados.

Las cepas aisladas en medios de cultivo no siempre representan la ecología bacteriana presente en las muestras de quesos, ya que algunas especies dependen de otras para su desarrollo, y eso se demuestra en el estudio de la diversidad microbiana del complejo ecosistemas donde se realiza la extracción directa de ADN o ARN de toda la muestra, para después por métodos moleculares identificar los microorganismos específicos, especialmente en el análisis del fragmento 16S rADN y rARN basado en la desnaturalización de las diversas secuencias como la electroforesis en gel de gradiente (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993; Coppola *et al.*, 2001; Randazzo *et al.*, 2002), la electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE) (Cocolin *et al.*, 2000), electroforesis en gel de temperatura temporal (TTGE) (Ogier *et al.*, 2002).

Ercolini *et al.*, (2003) realizaron estudios de la comunidad bacteriana presente en quesos stilton elaborados con leche pasteurizada, donde reportan que el recuento microbiológicos mostraba la presencia de los diferentes grupos específicos de bacterias, comparándolo con el análisis de ADN bacteriano extraído en forma directa de las muestras de queso, donde evaluaron el fragmento 16S rADN por la PCR, identificando otras especies que no habían recuperado en los diferentes medios de cultivo.

En la literatura disponible existen pocas publicaciones que reportan extracción de ADN directo de la matriz del queso para identificar genes *hdc* y *tdc* (Ladero *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2006, 2007), quizá por la complejidad del proceso, o por las interferencias que las

diferentes matrices puedan presentar, lo que supone que es necesario realizar una adaptación de la metodología a las muestras de estudio.

## 2.5. Bibliografía

1. Alberto M R; Arena M E; Manca de Nadra M.C. (2004). Differences between biogenic amines detection by HPLC methods using OPA and dansyl derivates. *Methods in molecular biology, Public Health Microbiology Methods and Protocols* 268: 481-487.
2. Aliakbarlu J; Alizadeh M; Razavi-Rohani S; Vahabzade Z; Saei S; Agh, N. (2009). Effects of processing factors on biogenic amines production in Iranian white brine cheese. *Research Journal of Biological Sciences* 4 (1): 23 –28.
3. Anónimo. (1994a). Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos madurados y procesados. Especificaciones.
4. Anónimo. (1994b). NOM-113-SSA1-1994 Método para la cuenta de microorganismo coliformes totales en placa.
5. Anónimo. (1993). Norma Oficial Mexicana, NOM-028-SSA1-1993.bienes y servicios. Productos de la pesca. Pescados en conserva. Especificaciones sanitarias.
6. Anónimo. (1985). NMX-F-209-1985. Alimentos. Lácteos. Queso Tipo Chihuahua Foods. Lacteos. Chihuahua Type Cheese. Normas Mexicanas. Dirección. Genera de Normas.
7. Arena M E; Nadra Manca de. (2001). Biogenic Amine Production by *Lactobacillus*. *Journal of applied Microbiology*. 90:158-162.
8. Anta M; Bravo J M; Fernández S; Goffaux O; García-Castrillo L. (2001). Escombrientoxicación por consumo de bonito. *Emergencias*; 13: 132.
9. Araújo VS; Pagliares VA; Queiroz ML; Freitas-Almeida AC. (2002). Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Applied Microbiology*. 92, 1172-1177.
10. Aygün O; Schneider E; Scheuer R; Usleber E; Gareis M. (1999). Comparison of ELISA and HPLC for the Determination of Histamine in Cheese. *J. Agric. Food Chem.* 47 (5), pp 1961–1964.
11. Bhardwaj A; Gupta H; Iyer R; Kumar N; Malik RK. (2009). Tyramine-producing enterococci are equally detected on tyramine production medium, by quantification of tyramine by HPLC, or by tdc gene-targeted PCR. *Dairy SciTechnol* 89: 601-611.

12. Beresford T; Fitzsimons N; Brennan N; Cogan T. (2001). Recent advances in cheese microbiology. Dairy Products Research. Vol. 11. p 259–272.
13. Bieck P.R; Antonin K.H. (1993). Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors. Monoamine Oxidase Basic and Clinical Aspects. Ed. Bookcraft. p 177-194.
14. Bodmer S; Imark C; Kneubuhl. (1999). Biogenic amines. Inflammation Research in food: Histamine and food processing. Vol. 48 (6) 296-300.
15. Bonetta S; Bonetta S; Carraro E; Coisson J.D; Travaglia F; Arlorio M.(2008). Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese. *J. Food Prot.* 71, 205–209.
16. Bover-Cid S; Hugas M; Izquierdo-Pulido M; Vidal-Corou M C. (2001). Amino Acid-Decarboxylase Activity of Bacteria Isolated from Fermented Pork Sausages. *Internacional Journal of Food Microbiology.* 66: 185-189.
17. Brito J R; Santos E M; Arcuri EF; Lange C C; Brito M.A; Souza G.N; Cerqueira M.M; Beltran J.M.S., Call J; Liu Y; Porto-Fett A.C; Luchansky J.B. (2008). Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4954–4961.
18. Bozkurt H; Erkmen O. (2004). Effects of Temperature, Humidity and Additives on the Formation of Biogenic Amines in Sucuk during Ripening and Storage Periods. *Food Science and Technology International.* Vol. 10, págs.21-28.
19. Burdychova R; Komprda T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol*; 276(2):149-55.
20. Callon C; Gilbert F. B; Cremoux, R. D; Montel M. C. (2008). Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control*, 19, 143–150.
21. Cervantes E F; Villegas G A; Cesín V A; Espinoza O A. (2008). Los Quesos Mexicanos Genuinos. Patrimonio que debe rescatarse. Universidad Autónoma de Chapingo y Mundi prensa México.
22. Contreras M; Izquierdo P; Allara M; García A; Torres G. Y; Céspedes, E. (2007). Determinación de aminas biógenas en quesos madurados. *Revista científica Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad del Zulia* 17 (1):89-95.



23. Coppola S; Blaiotta G; Ercolini D; Moschetti G. (2001). Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* 90, 414-420.
24. Curry B; Crow V. (2003). *Lactobacillus* spp. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Ed. Roginski H.; Fuquay, J. W. y Fox P F. Academic Press. Imprint of Elsevier Science. p. 1479-1511.
25. De las Rivas B; Marcobal A; Carrascosa A V; Muñoz R. (2006). PCR detection of food bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. *Journal Food Prot* 69:2509–2514.
26. De Vuyst L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology.* 38, 105–112.
27. Domínguez L A; Villanueva C A; Arriaga J C; Espinoza O A. (2011). Alimentos artesanales y tradicionales: el queso Oaxaca como un caso de estudio del centro de México, *Estudios Sociales.* vol.19, n.38, pp. 165-193.
28. Eerola S; Hinkkanen R; Lindfors E; Hirvi Timo. (1993). Liquid Chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International* 76-3: 575-577.
29. Edwards S; Sandine, W. (1981). Public health significance of amines in cheese. *J. Dairy Sci.* 12 (64): 2431-2438.
30. Ekici, K; Sekeroglu R.; SancakY. C.; Noyan T. (2004). Note of histamine levels in Turkish style fermented sausage. *MeatSci.* 68, 123–125.
31. Elsanhoty RM; Mahrous; Ghanaimy GA.(2009). Chemical, microbial counts and evaluation of biogenic amines during the ripening of egyptian soft domiati cheese made from a raw and pasteurized buffaloes milk. *International journal of dairy science.* 4 (2) p 80-90.
32. Ercolini D; Philip J. Hill PJ; Christine E. R. Dodd CE. (2003). Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 69, No. 6 p. 3540–3548
33. Fantasia L D; Mestrandrea L; Schrade JP; Yager J. (1975). Detection and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* in soft ripened cheese. *Applied Microbiology, American Society For Microbiology* p. 179-185.

34. Fernández M; Flores AB; Linares DM; Mayo B and Alvarez M. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*. 74 276–282.
35. Fernández M; del Río B; Linares D M; Martín M C; Álvarez M A. (2006). Real time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine producing bacteria: use in cheese production. *J. Dairy Sci.* 89, 3763–3769.
36. Fernández M.A; Bravo González J.M; Fernández Rozas S; Gómez-Caro G; García-Castrillo L. (2001) Escombriotoxicación por consumo de bonito. *Emergencias* 13:132-135.
37. Fernández J. O; Ferreira M. A. (2000). Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A* 886: 183-195.
38. FDA. U.S. (1997). Food and Drugs Administration. Fish and Fishery Products Hazard and Control Guide.
39. Finberg J; Gillman K. (2011). En *International review of Neurobiology Monoamine Oxidases and their Inhibitors* Vol.100. Editado Moussa Youdim, Peter Riederer. P169-185.
40. Fox P F; Law J; McSweeney P L H; Wallace J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: General Aspects, 2da ed, pp 389–438.
41. Fox, P.F. (1993a). Cheese: an Overview. En P. Fox (Ed.). *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1. 2da edición. pág. 1-36.
42. Fox P. F. (1989) Proteolysis in cheese during manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*. 72,1379-1400.
43. Galván D M. (2005) Proceso básico de la leche y el queso. *Revista Digital Universitaria*. 10 de septiembre Volumen 6 Número 9.  
<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num9/art87/int87.htm>
44. Garcia-Maruno E; Carrascosa A V; Muñoz R. (2005). A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin layer chromatography. *Journal of Food Protein* 68(3): 625-629.

45. Gerrit S; Bart S; Wim J; Engels W. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* vol.29 p 591–610.
46. González de Buitrago J.M. (2004). Técnicas de biología molecular en Laboratorio clínico 2da edición Editorial Masson. p 247-272.
47. Guinee T P; Fox P F. (2004) Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects in Cheese. Chemistry Physics, and Microbiology- General Aspects. Vol. 1. P.F. Fox. Elsevier Applied Science. Essex, England. Pages 207-260.
48. Haláz A; Baráth A; Simon-Sarkadi L; Holzapfel W. (1994). Biogenicamines and their production by microorganisms in food. *Trends in food Science & Technology* Vol 5, (2) p.42-49.
49. Hirata N; Takeuchi, K; Ukai K; y Sakakura, Y. (1999). Expression of histidina decarboxylase messenger RNA and histamine N-methyltransferase messenger RNA in nasal allergy. *Clin. Exp. Allergy*. 29, 76-83.
50. Izquierdo P; Allara M; Torres G; García A. (2003). Queso madurado Manchego, Parmesano y de Año. *Revista científica FCV*. Vol. XIII No 6 p431-435.
51. Izquierdo P; Allara M; García A; Torres G; Rojas B; Piñero MY. (2006). Aminas Biógenas y bacterias en salchichón tipo Milano: Efecto del tiempo de almacenamiento. *Revista. Científica (Maracaibo)*. 16-2:186-194.disponible:  
[.http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S079822592006000200013&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079822592006000200013&lng=en&nrm=iso)
52. Jeffery R. Broadbent and James L. Steele B; Steele J. (2005). Cheese Flavor and the Genomics of Lactic Acid Bacteria Genomics and molecular biology are valuable in helping to define how these bacteria contribute to the flavor and texture of cheeses. *ASM News Y*. Volume 71, Number 3, p 121-128.
53. Joosten H M; Northolt MD. (1989). Detection, growth, and amine-producing capacity of Lactobacilli in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:9:2356-2359.B
54. Karovicova J; Kohajdova Z. (2005). Biogenic Amines in Food. *Chem.Pap*.59-1: 70-79.
55. Ladero V; Calles M; Álvarez M F; Álvarez M A. (2010). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC).

56. Ladero V; Fernández M; Álvarez MA. (2009). Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses. *International Dairy Journal* 19 p 759–762.
57. La Gioia F; Rizzotti, L; Rossi, F; Gardini F; Tabanelli G; Torriani S. (2011). Identification of a tyrosine decarboxylase gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and analysis of its expression and tyramine production in milk. *Appl. Environ. Microbiology*. 77, 1140–1144.
58. Lorencova E; Bunkova L; Matoulková D; Dráb V; Pleva P; Kubán V; Bunka F. (2012). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. In *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 47, p. 2086-2091.
59. Latorre-Moratalla M.L; Bosch-Fusté J; Lavizzari T; Bover-Sid S; Veciana- Nogués M.T; Vidal-Carou M.C. (2009). Validation of an ultrahigh pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of Chromatography A* 1216: 7715-7720.
60. Lavizzari T; Veciana-Nogués M.T; O Weingart O; Bover-Cid S; Mariné-Font A; Vidal-Carou M.C. (2007). Occurrence of Biogenic Amines and Polyamines in Spinach and Changes during Storage under Refrigeration. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (23), pp 9514–9519.
61. Law B A; Kolstad J. (1983). Proteolytic system in lactic acid bacteria. *Antoine van-Leeuwenhoek* 49. 225-245.
62. Le June C; Lonvaud-Funel A; Ten Brink H; Hofstra; Van der Vossen J.M.B. (1995). Development of detection. System for histidine decarboxylating lactic acid bacteria on DNA probes, PCR and activity test. *Journal of applied Bacteriology* 78, 316-326.
63. Leszczyńska J; Wiedlocha M; Pytasz U. (2004). The Histamine Content in Some Samples of Food Products *Czech Food Sci.* vol 22 (3) 81-86.
64. Linnan MJ; Mascola L; Lou XD; Goulet V; May S; Salminen C; Hird DW, Yonekura ML; Hayes P; Weaver R. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med.* 29; 319(13):823-8.
65. Livingston MG; Livingston HM. (1996). Monoamine oxidase inhibitors. An update on drug interactions. *Drug Saf* 14, 219–227

66. López M F; Álamo G C. (2007). Historia de la psicofarmacología. Editorial Médica Panamericana. España p 360.
67. Madigan M; Martiniko J. (2006). La diversidad procariota: bacterias. En Biología de los microorganismos Brock. España. 10 Ed. Editorial Pearson Prentice Hall.p 398-340.
68. Maijala R L. (1993). Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. Letters in Applied Microbiology 17, 40–43.
69. Maintz L; Novak N. (2007). Histamine and histamine intolerance. The American Journal of Clinical Nutrition. 85-5 1185-1196.
70. Marcobal A; De la Rivas B; Muñoz. (2006). Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey. Journal of Consumer Protection and Food Safe. p 187-196.
71. Marine i Font. (2005). Institut D'estudis Catalans secció de ciències biològiques Barcelona. <http://www.iecat.net/butlleti/48/cronica/ANIMES.pdf>
72. Marino M; Maifreni M; Moret S; Rondini. (2000). The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. Letters in Applied Microbiology, p169 y173.
73. Mayer H.K; Fiechter G; Fischer E. (2010). A new ultrahigh pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. Journal Chromatography A 1217, 3251–3257.
74. Mazzuco E; Gosette F; Bobba M; Marengo E; Robotti E; Gennaro M C. (2010). High-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. Applications in food chemistry. Journal Agric. Food Chem.13; 58(1): 127-134.
75. McCabe-Sellers B; Staggs C; Bogle M. (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. Journal of Food Composition and Analysis 19. p 58–65.
76. McSweeney P L H. (2004). Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol 1: General Aspects, 3rd ed, p 347–360.

77. Milesi M M. (2008). Tesis Doctoral: Desarrollo de fermentos adjuntos para queserías a partir de bacterias lácticas no pertenecientes al fermento. Universidad Nacional del Litoral.
78. Mohamed A.G; Deabes MM; Fatma Hassan AM; Enab KA; Abou-Arab AA. (2013). Biogenic amines and chemical composition of different formulations used for manufacture of processed cheese. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(3): 1477-1483.
79. Morrow J; Margolies G.R; Rowland J L; Jackson Robert J. L. (1991). Evidence That Histamine Is the Causative Toxin of Scombroid-Fish Poisoning. *The journal New England of Medicine*. 324:716-720.
80. Muyzer G; de Waal E.C; Uitterlinden AG. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695– 700.
81. Najand M L; Ghanbarpour R. (2006). A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese. *Vet. arhiv* 76, 531-536.
82. Niven C.F; Jeffrey M.B; Corlett D.A. (1981). Differential plating medium for quantitative detection of histamine forming bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 321–322.
83. Novella-Rodriguez S; Veciana-Nogues M.T; Izquierdo-Pulido M; Vidal-Carou, M.C. (2003). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese, *J. Food Sci.*, 68, 720-750.
84. Ogier J.C; Son O; Gruss A; Tailliez P; Delacroix-Buchet A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3691–3701.
85. Onal A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* 103 (4): 1475 -1486.
86. Ordoñez A; Ibañez F; Torre P; Barcina Y. (1997). Formation of biogenic amines in Adiazábal ewe's milk cheese: effect of ripening, pasteurization, and starter. *Journal of Food Protection* 60 (11): 1371 – 1375.
87. Parra Huerta R. (2010). Revisión: Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad Ciencias Agropecuarias*. vol. 8. No. 1.

88. Petridis KD; Steinhart H. (1995). Automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde (OPA). A new RP-HPLC method for the determination of biogenic amines in food. *Z Lebensm Unters Forsch.* 201(3):256-60.
89. Pinho O; Pintado A; Gomes A; Pintado M; Malcata F; Ferreira I. (2004). Interrelationships among microbiological, physicochemical, and biochemical properties of Terrincho cheese, with emphasis on biogenic amines. *Journal of Food Protection* 67 (12): 2779 - 2785.
90. Ramos-Izquierdo B; Bucio-Galindo A; Bautista-Muñoz C; Aranda-Ibáñez D; Izquierdo-Reyes F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y ciencia* [online]. 2009, vol.25, n.2, pp. 159-171. ISSN 0186-2979.
91. Randazzo L; Torriani S; Akkermans A; De Vos W; Vaughan E. (2002). Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis Applied and Environmental Microbiology, 2 Vol. 68, p1882–1892.
92. Rang P; Dale M M. (2008). Biogenic amine production by Gram-positive bacteria isolated from Spanish dry-cured ‘chorizo’ sausage treated with high pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*, 80: 272–277.
93. Ratnam S; March SB. (1986). Laboratory studies on salmonella-contaminated cheese involved in a major outbreak of gastroenteritis. *Journal Applied Bacteriology*. 61(1):51-6.
94. Ray B; Bhunia, A. (2008). Bioquímica de algunas características favorables en *Fundamentos Microbiología de los Alimentos*. 4ta edición McGrawHill.p77-79.
95. *Revista del consumidor*. (2011).
96. [www.consumidor.gob.mx/wordpress/wp-content/uploads/2012/03/queso\\_panela.pdf](http://www.consumidor.gob.mx/wordpress/wp-content/uploads/2012/03/queso_panela.pdf)
97. *Revista del consumidor* (2000). [www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est\\_00/quesos.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_00/quesos.pdf)
98. Rodríguez S; Barrera S. (2004). La reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *UANL. Jun –Sep. Vol. VII, núm. 003. P.323-335.*
99. Roig-Sauge’s AX; Molina AP; Hernández-Herrero MM. (2002). Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheese. *Eur Food Res Technol.* 215:96-100.

100. Roig-Sague's AX; Hernández-Herrero MM; López-Sabater EI; Rodríguez-Jerez J J; Mora-Ventura MT. (1997). Evaluation of three decarboxylating agar media to detect histamine and tyramine-producing bacteria in ripened sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 309–312.
101. Ross T; McMeekin T.A; y Baranyi J. (2000). Predictive microbiology and food safety. En: *Encyclopedia of Food*.
102. Ruiz Capillas C; Jiménez –Colenero F. (2004). Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Reviews in Food Science and Nutrition; Health & Medical Complete* 44: 489-499.
103. Russo P; Spano G; Arena M P; Capozzi V; Grieco F; Beneduece L.(2010). Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food? *Technol.Appl.Microbiology. Biotechnology*. 1087–1095
104. Sambrook J; Fritsch E F; Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.
105. Sheehan J J; Wilkinson MG; McSweene PLH. (2008). Influence of processing and ripening parameters on starter, non starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 18, 905-917.
106. Schirone M; Tofalo R; Mazzone G; Corsetti A; Suzzi, G. (2011). Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. *Food Microbiol.*28, 128–136.
107. SIAP-SAGARPA. (2010) Boletín leche 2010; <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>).
108. SAGARPA. (2010). Elaboración de quesos tipo Panela y Oaxaca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Elaboraci%C3%B3n%20de%20quesos.pdf>
109. Silla-Santos M H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29 (2/3): 213 – 231.
110. Smela D; Pechova P; Komprda T; Klejdus B; Vlastimil K. (2003). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat product during fermentation and long –term storage. *Czech J. Food Sci* 21-5:167-175.



111. Standarová E; Varlová L; Kordiovská P; Janstová B; Dracková M. (2010). Biogenic Amines production in Olomoc Curd cheese at various strong conditions. *Acta Vet Brno* 79:147-156.
112. Stratton JE; Hutkins RW; Taylor SL. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review *Journal of protection*. 54(6) P. 460-470.
113. Stratton J E; Hutkins R W; Sumner S S; Taylor S L. (1992). Histamine and histamine-producing bacteria in retail Swiss and low-salt cheeses. *J. Food Prot.* 55: 435-439.
114. Sumner S; Speckhard M; Somers E; Taylor S. (1985). Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. *Applied Environm. Microbiol.* 50 (4):1094-1096.
115. Suzzi G; Gardini F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88:41-54.
116. Taylor S. (1985). Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. *World Health Organization. VPH/FOS/ 85 (1): 1 - 47.*
117. Tunick M H; Van Hekken D J; Molina-Corral F J; Tomasula P T; Call J; Luchansky J; Gardea A A. (2008). Queso Chihuahua: manufacturing procedures, composition, protein profiles, and microbiology. *International Journal of Dairy Technology.* Vol. 61, p 62-69.
118. Vale S.M; Glória B. (1998). Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food chemistry.* Vol. 63 p343-348.
119. Valle Vega P. (2006). Tóxicos presentes en los alimentos. En *Química de los alimentos.* Badui 4º edición Editorial Pearson Addison Wesley. México. p-565-601.
120. Van Cauteren D; Jourdan-da Silva N; Weill F X; King L; Brisabois A; Delmas G; Vaillant V; de Valk H. (2009). Outbreak of *Salmonella enterica* serotype muenster infections associated with goat's cheese, France. March 2008. *Eurosurveillance* Vol. 14 Issue 31 6..
121. Van Hekken D L M. H; Tunick P M; Tomasula F. J; Molina-Corral A. A; Gardea. (2007). Mexican Queso Chihuahua: Rheology of fresh cheese. *Int. Journal Dairy Technolgy.* 60:5–12.
122. Vidal C; Font Marine; Hernández T. (1999). Nutrición y tratamientos farmacológicos. Interacciones entre alimentos y medicamentos. En *Tratado de Nutrición.* Madrid. Editorial Díaz Santos. p 543-556.

123. Villegas A; Cervantes F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*, vol. 19. pp. 146-164.
124. Villegas-de-Gante A. (2004). *Tecnología Quesera*. Editorial Trillas. México
125. Viña J.R; Viña J; (1994). Biosíntesis y catabolismo de aminoácidos específicos en: *Bioquímica Herrera E. 2ª edición Vol. 1 editorial Interamericana. McGraw-Hill España* pp833-868.
126. Yde M; Botteldoorn N; Bertrand S; Collard JM; Dierick K. (2010). Microbiological and molecular investigation of an increase of human listeriosis in Belgium, 2006-2007. *Euro Surveill*; 15(6): pp.19482.
127. Yildirm H. K; Uren A; Yücel U. (2007). Evaluation of Biogenic Amines in Organic and Non-Organic Wines by HPLC OPA Derivatization. *Food Technol. Biotechnol.* 45-1:62-68.

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3. Muestras de quesos**

Se seleccionaron 8 quesos madurados chihuahua y tipo chihuahua de marcas diferentes que se comercializan en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México. Los quesos fueron elaborados con leche pasteurizada de vaca, los cuales fueron adquiridos en supermercados. Las muestras se mantuvieron a temperatura de refrigeración (2-8°C) durante el traslado del lugar de venta hasta el laboratorio. De los 8 quesos se seleccionaron tres muestras de cada uno y los análisis se realizaron por duplicado.

#### **3.1. Codificación y almacenamiento**

A cada uno de los quesos se les asignó un código de una letra, se registraron los datos de identificación, así como la fecha de elaboración, de caducidad y lote de producción. Los quesos se mantuvieron en refrigeración a 1°C durante todo el estudio.

#### **3.2. Microorganismos control con enzima histidina y tirosina descarboxilasa**

Se seleccionaron dos cepas como controles positivo para los diferentes análisis: a) *Lactobacillus 30a* ATCC 33222, contiene la enzima histidina descarboxilasa, la cual depende de un pH ácido regulado para que se origine la descarboxilación de la histidina dando como producto histamina y CO<sub>2</sub> (Schelp *et al.*, 2001) y b) *Lactobacillus brevis* ATCC 367 utilizada como control positivo para la enzima tirosina descarboxilasa.

Las cepas utilizadas en este proyecto se activaron y mantuvieron en el caldo MRS (medio de cultivo recomendado por ATCC).

Se verificó en el Banco de genes del Centro Nacional de Información Bacteriológica (NCBI) que las cepas de microorganismos utilizados como control presentaran las enzimas descarboxilasas necesarias (NCBI, 1911).

#### **3.3. Caracterización de quesos**

Se realizaron los análisis fisicoquímicos y microbiológicos que establecen las Normas oficiales mexicanas y a continuación se describen.

### **3.3.1. Determinación de la concentración de NaCl**

La metodología empleada, esta descrita en la Norma Oficial Mexicana (NMX-F-328-S-1981). Se pesaron 2g de la muestra de queso en 100mL de H<sub>2</sub>O, la suspensión se colocó durante 3 minutos en agitación, posteriormente la mezcla se filtró (papel Wathman No 1) y del filtrado se tomó una alícuota de 25mL, se colocó en un matraz erlenmeyer se le agregó 1mL de cromato de potasio y se tituló con una solución de nitrato de plata al 0,1N y se calculó la concentración de NaCl por los mililitros utilizados en la titulación (Anónimo, 1981).

### **3.3.2. Determinación del porcentaje de proteína y nitrógeno**

Se utilizó método aprobado por AOAC 990.03 el cual se basa en el método de combustión utilizando un equipo Leco<sup>®</sup>/Dumas (modelo FP-528 DSP Corporation Michigan USA). Para la determinación del porcentaje de nitrógeno se procedió a pesar 2,0 mg de la muestra de cada queso, esta fue envuelta en papel de estaño, se colocó en el cabezal de carga e ingresó al horno calentado a 850°C (AOAC, 2005).

El equipo presenta los resultados en porcentaje de nitrógeno y por cálculo se obtiene el porcentaje de proteína total. Se utilizó el factor de conversión de 6,38.específico para productos lácteos (Jung *et al.*, 2003).

### **3.3.3. Determinación del porcentaje de nitrógeno amoniacal**

La determinación de nitrógeno amoniacal es de utilidad para detectar la presencia de grupos amino libres por hidrólisis de las proteínas, por lo que se considera un indicador de proteólisis. Esta determinación se realizó por la técnica de Kjeldahl como se describe en la Norma Oficial. Determinación de proteínas en quesos (Anónimo, 1976) en un matraz Kjeldahl se colocaron 5g de la muestra de queso seco y 250 mL de agua destilada, 3g de Zn, 6 perlas de vidrio y 0,25 g de óxido de magnesio Se realizó la digestión de la muestra y posteriormente se recupera el nitrógeno en un una destilación en 100mL de solución de ácido sulfúrico al 0,1N. Se destiló hasta un volumen de 250 mL, se tituló con NaOH a una concentración 0,1N utilizando como indicador rojo de metilo al 1% en alcohol etílico. El cálculo se realizó con la siguiente fórmula.

Fórmula para calcular el % N amoniacal

$$\%N = \frac{(Vb - Vm) \times 0.1N \times 0.014}{\text{Peso (g)}} \times 100$$

#### **3.3.4. Humedad por el Método AOAC 926.08**

Se realizó la determinación de contenido de humedad utilizando una capsula de porcelana, la cual fue llevada a peso constante, en la capsula se agregaron 5 g de la muestra de queso y se colocó en la estufa durante 4 horas, una vez transcurrido este tiempo, la capsula con la muestra seca se pesó. El cálculo de humedad se realizó de la siguiente manera (AOAC, 1995).

$$\% \text{ de humedad} = (\text{PMH}-\text{PMS})/\text{PMH} \times 100.$$

Donde:

PMH = Peso de la muestra húmeda

PMS = Peso de la muestra seca.

#### **3.3.5. Determinación del pH de las muestras de queso**

La metodología empleada esta descrita en la Norma Oficial NMX-F-099-1970. Se pesó un gramo de muestra de queso y se homogenizó con 10 mL de agua destilada, se determinó el pH utilizando un potenciómetro (HANNA HI Ph/OrR meter, E.U.A.) (Anónimo, 1970).

#### **3.3.6. Determinación de grasa de las muestras de queso**

La determinación de grasa se realizó por el método de Goldfish el cual se basa en la extracción continua por disolvente, a la muestra se le hace pasar vapor de disolvente (éter etílico) en el aparato extractor (Goldfish) bajo reflujo constante.

El solvente se separó del extracto por destilación y posteriormente fue llevado a desecar a 90°C en la estufa (AOAC, 2002).

#### **3.3.7. Determinación de cenizas de las muestras de queso**

Las muestras se calcinaron en una mufla entre 500-600°C previa combustión de la materia orgánica hasta obtener un residuo gris como lo describe la NOM 066 (Anónimo, 1978).

#### **3.3.8. Calidad microbiológica de quesos**

Durante la primera semana de la adquisición de los quesos se realizó el análisis microbiológico que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos madurados y procesados y la NMX-F-209-1985. Alimentos.

Lácteos. Queso Tipo Chihuahua. Foods. Lacteos. Chihuahua Type Cheese. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Se determinó la cuenta total de bacterias, de hongos y levaduras y la presencia de coliformes, ausencia de patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria* (Anónimo, 1994a, Anónimo, 1985).

### **3.3.9. Cuenta de mesófilos aerobios**

Se realizó la cuenta de mesófilos aerobios mediante la siembra en agar soya tripticaseína, las muestras se incubaron a 37°C por 24 h como establece la NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa (Anónimo, 1994d).

### **3.3.10. Cultivo para bacterias coliformes**

Se realizaron siembras de cada queso en el medio de cultivo Rida<sup>®</sup> COUNT coliform. (R-Biopharm AG Darmstadt, Germany) se incubaron durante 24 h a 35°C. También se investigó la presencia de *Echerichia coli*, en Placas Petrifilm<sup>MR</sup> para recuento de *E. coli*/Coliformes) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

### **3.3.11. Hongos y levaduras**

La determinación de mohos y levaduras se realizó en placas Petrifilm<sup>MR</sup> YM (*E. Mohos/levaduras*) siguiendo las instrucciones del fabricante, distinguiendo a las levaduras como colonias típicamente azules pequeñas y con bordes definidos, y los hongos como colonias grandes, de colores variables, con centro oscuro y forma difusa.

### **3.3.12. Salmonella**

Utilizando el método de la AOAC (998.09) se investigó la presencia de *Salmonella* en 25 g de muestra de quesos, se utilizó el método de ELISA (Pruebas 3M, Tecra, EUA) (AOAC, 2001).

### **3.3.13. Listeria**

Se analizó la presencia de *Listeria* en 25g de muestra de queso utilizando el método AOAC (995.22) mediante la técnica de ELISA (Pruebas 3M, Tecra, EUA) (AOAC, 2000).

#### **3.3.14. Cuenta de Bacterias Ácido Lácticas (BAL)**

Para realizar la cuenta de colonias de bacterias BAL de las muestras de quesos se pesaron 10 g de queso y se colocaron en frascos estériles para ser homogenizados con 90 mL de solución salina al 0,85%, se realizaron diluciones secuenciales. Se sembraron en agar MRS y se incubaron a 37°C en anaerobiosis utilizando Gas-Pack-System durante 48 h. La determinación de BAL se realizó por duplicado para cada queso (González-Martínez, 2005).

#### **3.4. Análisis de microorganismos productores de aminos biógenas**

El análisis microbiológico consistió en la búsqueda e identificación de los microorganismos productores de aminos biógenas en los quesos. Se aislaron los microorganismos Gram positivos y negativos con medios selectivos, y se probaron en los medios selectivos con el aminoácido histidina o tirosina. Posteriormente de los tubos positivos para la descarboxilación de aminoácidos se cultivaron nuevamente los microorganismos en el medio selectivo para su identificación bioquímica.

##### **3.4.1. Cultivo de bacterias Gram positivas**

Para investigar en los quesos las bacterias Gram positivas con enzimas amino descarboxilasa se realizaron tres siembras de cada queso en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) incubando en anaerobiosis durante 48 h a 37°C, con el procedimiento siguiente: se pesaron 10 g de cada queso, y se colocaron en frascos estériles para ser homogenizados con 90 mL de citrato de sodio al 2%, se realizaron diluciones decimales hasta  $10^5$  (Anónimo 1994c). Se incubaron en anaerobiosis durante 48 h a 37°C (Pintado *et al.*, 2008). A las colonias desarrolladas en el agar se les realizó una tinción de Gram donde se comprobó la presencia de bacilos Gram positivo.

##### **3.4.2. Cultivo de bacterias Gram negativas**

Para investigar en las muestras de quesos la presencia de bacterias coliformes con enzimas amino descarboxilasa, se pesaron 10 g de cada queso, y se colocaron frascos estériles para ser homogenizados con 90 mL de solución salina al 0,85%, posteriormente fueron cultivados en el medio de cultivo Rida<sup>®</sup> COUNT coliform (R-Biopharm AG Darmstadt, Germany). Se realizaron tres siembras de cada queso, incubando durante 24 h a 35°C. Realizando una tinción de Gram para comprobar la presencia de bacilos Gram negativos.

### 3.4.3. Medios específicos para investigar cepas con la enzima HDC y TDC

Las colonias desarrolladas en el medio de cultivo MRS y Rida<sup>®</sup> COUNT se sembraron en medios selectivos para identificar bacterias con enzimas histidina y tirosina descarboxilasa (HDC y TDC). Los cultivos para identificar bacterias con enzimas histidina y tirosina descarboxilasa se realizaron en cuatro momentos de la vida de anaquel de las muestras de queso. Para esta investigación se efectuó una modificación de la técnica utilizada por Espinosa-Pesqueira, (2010) la cual consiste en un medio de cultivo sintético con histidina y tirosina como sustrato (Tabla 7).

**Tabla 7.** Especificaciones del caldo de cultivo para detectar bacterias amino descarboxilasa

REACTIVOS	Composición del caldo proteolítico descarboxilasa g/100mL	Composición del caldo fermentativo descarboxilasa g/100mL	pH
Peptona	0,125	0,25	
Extracto de levadura	0,125	0,25	
NaCl	0,25	0,25	
CaCO <sub>3</sub>	0,25	0,25	
Glucosa	0,05	0,001	
Purpura de Bromocresol	0,01	0,01	
<b>Aminoácidos:</b>			
L-Histidina	1,0	1,0	5,7
L-Tirosina	0,25	0,25	5,5

Se prepararon dos caldos de cultivos específicos, uno con el aminoácido histidina para detectar bacterias con enzima HDC y otro medio de cultivo con el aminoácido tirosina para detectar bacterias con enzima TDC. Tanto para bacterias proteolíticas y fermentativas.

El medio de cultivo específico estéril (1mL) se colocó en tubos eppendorf y fue inoculado con las colonias obtenidas de cada queso, y como control positivo las cepas *Lactobacillus30a* ATCC 33222 para el medio con histidina y la cepa *Lactobacillus brevis* ATCC 367 para el medio de cultivo con tirosina. Este procedimiento se realizó por duplicado. Como control



negativo se utilizó un tubo con el medio de cultivo específico con el aminoácido correspondiente, sin inoculación de bacterias.

Los microtubos con medio de cultivo selectivo fueron incubados a 30°C y revisado a las 24 y 48 h. La interpretación se basó en un cambio de coloración del medio causado por las reacciones bioquímicas al utilizar el aminoácido correspondiente, donde las bacterias con la enzima histidina y tirosina descarboxilasa originan la alcalinidad del medio de cultivo y se refleja en un color purpura, lo que indica la presencia de bacterias amino descarboxilasa. El viraje a un color amarillo indica acidificación, lo que significa que no hay crecimiento de bacterias productoras de aminas biógenas.

De los tubos que dieron positivo para las enzimas HDC y TDC se cultivaron de nuevo en MRS para aislar las diferentes colonias e identificar el género y especie de las bacterias con las enzimas HDC y TDC.

#### ***3.4.4. Identificación bioquímica Método API***

Las colonias Gram positivas que presentaron descarboxilación en medios específicos se cultivaron nuevamente para la identificación de género y especie, en agar MRS a fin de obtener abundantes crecimiento.

Para la identificación se utilizó el sistema multiprueba API<sup>®</sup> 50 CH (bioMérieux, Francia) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se obtuvo el género y especie al ser comparados los resultados con una base de datos a través del software del sistema API (BioMérieux, 2010).

### **3.5. Cuantificación de histamina y tiramina por HPLC**

Para la cuantificación de las aminas biógenas en las muestras de queso se utilizó el método AOAC (954.04). Este método es sensible para la identificación y cuantificación de las aminas biógenas en diferentes alimentos y consiste en la extracción del compuesto, la formación de un derivado con o- fthaldialdehído (OPA) y la detección de la fluorescencia desarrollada (AOAC 1997).

#### ***3.5.1. Extracción de histamina y tiramina de las muestras de queso***

La preparación de las muestras se realizó como lo describe Elsanhoty *et al.*, (2009). Se homogeneizaron 10g de queso con de ácido tricloracético al 10% en un homogenizador Ultra-

turrax<sup>®</sup> por 15min y se centrifugaron por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C (Centrífuga eppendorf<sup>®</sup> 5804 R) se filtraron usando papel Wathman N° 1, los filtrados se transfirieron a tubos corning 15 mL, la operación se repitió dos veces y los filtrados fueron combinados y puestos en refrigeración a - 20°C.

### ***3.5.2. Estandarización de la técnica***

Los estándares utilizados para el HPLC fueron dihidrocloruro de histamina e hidrocloreto de tiramina de la marca a Sigma-Aldrich (EUA). Para realizar las curvas de calibración de los estándares se prepararon soluciones de cada estándar a concentración de 1600 mg/L, a partir de estas soluciones de tiramina e histamina se prepararon soluciones en diferentes concentraciones, (400 mg/L; 250 mg/L; 100 mg/L; 50 mg/L; 25 mg/L) realizando diluciones en ácido tricloracético al 5%. Se construyó una curva de calibración promedio con 4 niveles de concentración, el cual se realizó en base a 6 repeticiones independientes para histamina y tiramina.

Se utilizó un cromatógrafo HPLC con detector de fluorescencia (Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>) con una longitud de onda de absorción de 338 nm y 430 nm de emisión, como fase estacionaria se utilizó una columna marca Waters<sup>®</sup> ultrasphere ODS C18.

Para la cuantificación de las aminas en HPLC mediante el detector de fluorescencia se realizó la formación de derivados fluorescentes con la siguiente metodología. Se tomaron 300 µL de la mezcla de estándares o de las muestras de queso al que se le agregaron 120 µL de solución tampón de boratos y 120 µL de reactivo de o-ftaldialdehído (OPA). Se inyectaron 10 µL de muestra al cromatógrafo.

Se utilizó un gradiente de elusión con una mezcla de fosfato dibásico de potasio y fosfato monobásico de potasio con un pH final de 6,5 (solvente A) y acetonitrilo (solvente B) comenzando 85:15% respectivamente, incrementando B a 60% en 7,5 min. El flujo utilizado fue de 0,9 mL/min incrementado al final a 1,3 mL/min (tabla 8).

**Tabla 8.** Condiciones de la fase móvil para cromatografía

PASO	TIEMPO	Solventes		FLUJO
		A%	B%	
1	0	85	15	0,9
2	0-3	85	15	0,9
3	3-5	75	25	0,9
4	5-7,5	75	25	1,3
5	7,5-24,5	40	60	1,3
6	24,5-49,5	55	15	1,3
7	49,5-59,5	85	15	1,3

### **3.5.3. Cuantificación histamina y tiramina en tres momentos de la vida de anaquel**

La cuantificación de las aminas (histamina y tiramina) se realizó en tres momentos de su vida de anaquel, durante la primera semana de la adquisición de los quesos, a la mitad de su vida de anaquel y en la fecha de caducidad. La cuantificación se realizó con la metodología descrita en el apartado 3.6.1 y 3.6.2 del presente documento.

### **3.6. Identificación molecular de bacterias productoras de aminas biógenas**

La identificación de bacterias productoras de histamina y tiramina en los quesos se realizó por medio de la técnica de PCR, amplificando secuencias específicas de los genes histidina descarboxilasa (*hdc*) y tirosina descarboxilasa (*tdc*), como se describe en los siguientes apartados.

#### **3.6.1. Selección de cepas de referencia usadas como control positivo**

Para establecer los protocolos moleculares que permitieran identificar la presencia de las bacterias productoras de las aminas biógenas en los quesos, se eligieron las cepas *Lactobacillus* 30a ATCC 33222 y *Lactobacillus brevis* ATCC 367 que poseen los genes *hdc* y *tdc*, respectivamente, y cuya secuencia genómica se encuentra disponible en el Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

### **3.6.2. Condiciones del cultivo de las cepas control**

Para la extracción de ADN de las cepas *Lactobacillus 30a* ATCC 33222 y *Lactobacillus brevis* ATCC 367, estas se cultivaron durante 48 h de crecimiento con agitación (200 rpm), en caldo de cultivo MRS (Man Rugosa Sharp). Las condiciones de cultivo fueron: crecimiento en condiciones de anaerobiosis a 37°C (*Lactobacillus 30a*) y crecimiento en aerobiosis a 30°C (*L. brevis*).

La extracción del ADN del *Lactobacillus 30a* ATCC 33222 se realizó por la metodología descrita por Randazzo y col, (2002). Esta técnica utiliza una combinación de medio mecánicos y químicos para el aislamiento del ADN usando perlas vidrio de 0,2 mm (de diámetro) y una mezcla de fenol-tampón TE (50:50) para romper la pared celular posterior precipitación del ADN con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).

### **3.6.3. Extracción de DNA de cepas control**

La extracción de ADN de la cepa *L. brevis* ATCC 367 se realizó por la técnica descrita por Hoffman y Winston (1987), en la cual se rompe la pared celular mediante fraccionamiento mecánico con perlas de vidrio y una solución tampón de lisis (TSNT) seguido por una purificación del ADN usando una mezcla de fenol-cloroformo (50:50) y precipitando el ADN con acetato de sodio y etanol absoluto.

### **3.6.4. Extracción directa de ADN bacteriano de los quesos**

Para la extracción directa de ADN bacteriano presente en los diferentes quesos con un contenido elevado de grasa (superior al 30%), se realizó una adaptación de la técnica utilizada por Randazzo y cols, (2002) y el ADN se purificó utilizando un kit (SV Total RNA Isolation System, Promega US) , para lo cual se colocaron 5 g de queso en un frasco de dilución estéril (130 mL con tapón de rosca) que contenía 40mL de una solución estéril de citrato de sodio al 2%. Después de una incubación a 45°C por 30 min, se le agregaron perlas de vidrio de 0,1 mm de diámetro, estériles, la mezcla se agitó por 5 min, se dejó reposar 10 min. Posteriormente, 1mL del sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL, se centrifugó a 600g (Eppendorf mini spin, Hamburgo Alemania) por 3 min y se eliminó el sobrenadante, repitiéndose esto hasta obtener el pellet (producto de 10 mL). Al pellet obtenido del queso (fracción libre de grasas) se le resuspendió 100 µL de lisozima (Research organic, Ohio USA)

con una concentración de 1mg/100 mL, se llevó a incubación a 25°C con agitación durante 16 h. A la suspensión se le agregaron 175 µL de la solución tampón de lisis que contiene β-mercaptoetanol (48,7%) y 350 µL de la solución tampón de dilución (SV Total RNA Isolation System, Promega USA) se agitó, por inversión, esta mezcla se incubó a 70°C por 10 min, se centrifugó a 13000g por 10 min, la parte superior clara se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se le añadieron 200 µL de etanol absoluto, la mezcla se transfirió a una columna colocada en un tubo de recolección y se centrifugó a 4000g por 1 min, posteriormente se añadieron 500 µL de solución tampón de lavado y se volvió a centrifugar (4000g/por 1 min); se eliminó el filtrado y la columna se centrifugó nuevamente a 4000g por 3 min con el objetivo de eliminar de la membrana de la columna los restos de etanol. La columna con el ADN unido a la membrana se colocó en un tubo eppendorf estéril y se le agregaron 50 µL de agua pura, estéril y libre de ADNsas, se dejó a temperatura ambiente por 5 min, y se centrifugó a 9600g por 1 min, el ADN eluido de la columna se almacenó a -20°C, hasta su uso.

### ***3.6.5.-Comprobación de la presencia de ADN de origen bacteriano extraído de los quesos***

Para comprobar si el ADN extraído de los quesos era de origen bacteriano se realizó una amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos PO-F F (GAGAGTTTGATCCTGGCT CAG) y 338-R (GCTGCCTCCCGTAGGAGT) reportados previamente por Ventura y cols. (2001); estos oligonucleótidos permiten la amplificación de un fragmento de 332 pares de bases correspondiente al gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S rADN de bacterias. Para la reacción de PCR se preparó una mezcla de los siguientes reactivos en las concentraciones indicadas: 2,5 pmoles de los oligonucleótidos PO-F y 338-R; 0,5 U de Taq ADN polimerasa; 25µL de la solución tampón y 2 pmoles de los dNTPs y 2 µL de muestra (ADN extraído de quesos) en un volumen final de 25 µL. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Axygen (Therm-1000, Maxygene). Las condiciones de la reacción fueron: un ciclo de 95°C durante 5 min, 35 ciclos de 95°C durante 30 seg, seguido de 58°C por 1 min y 72°C durante 4 min, y un ciclo final de 72°C durante 7 min. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio y se

visualizaron bajo luz UV, con ayuda de un fotodocumentador “Gel/visión work” (UVP LSC. USA).

### **3.6.6. Identificación de los genes *hdc* y *tdc***

La presencia del gen *hdc* que codifica para la enzima histidina descarboxilasa, se determinó por medio de una amplificación por PCR sobre el ADN obtenido de los quesos utilizando las condiciones descritas por Fernández y cols, (2006). Los oligonucleótidos que se usaron fueron Hdc1 (TTGACCGTATCTCAGTGAGTCCAT) y Hdc2 (ACGGTCATACGAAACAATACC ATC). Se utilizó como control positivo de la amplificación, el ADN de *Lactobacillus 30a*, cepa ATCC 33222.

La reacción de PCR se desarrolló en un termociclador Axygen (Therm-1000 Maxygene) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 5 min, 35 ciclos de 95°C durante 45 seg, seguido de 50°C por 45 seg y 72°C durante 2 min, y un ciclo final de 72°C durante 5 min. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV, con ayuda de un fotodocumentador. “Gel/visión work”. (UVP LSC. USA).

Para la identificación del gen *tdc* el cual codifica la enzima tirosina descarboxilasa, se diseñaron oligonucleótidos degenerados. A partir de las secuencias de ADN reportadas en las bases de datos, se obtuvieron las secuencias de los genes que codifican para la enzima tirosina descarboxilasa de diferentes especies de bacterias.

Con ayuda de los Programas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y CLUSTAL-W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) se hizo un alineamiento de las secuencias, tanto al nivel de aminoácidos como de nucleótidos correspondientes a tirosina descarboxilasa y se identificaron las regiones conservadas. El alineamiento de las secuencias de nucleótidos permitió identificar las regiones más conservadas como posibles candidatos para el diseño de los oligonucleótidos degenerados. Sobre las secuencias de las regiones que presentaron mayor conservación, se diseñaron un par de oligonucleótidos degenerados: TER-F (GCWAAYYTD GARGGDYTHGTTATGC) y TER-2 (CCAWGAATARTGYTTHGTTTGTGG).

Para estandarizar las condiciones de PCR y determinar la especificidad de los oligonucleótidos degenerados para los genes *tdc*, se utilizó como control el ADN de *Lactobacillus brevis*, cepa ATCC 367 y se realizaron amplificaciones a diferentes temperaturas de alineamiento (gradiente de temperatura: 50 – 60°C) en un termociclador con gradiente de temperatura

Axygen (Therm-1000 Maxygene). En base a los resultados obtenidos se determinó la temperatura óptima para los oligonucleótidos degenerados.

Para determinar la presencia del gen *tdc* en el ADN obtenido de los quesos, se realizaron reacciones de PCR con las siguientes condiciones un ciclo de 95°C durante 5 min, 35 ciclos de 95°C durante 1 min, seguido de 48,3°C por 1 min y 72°C durante 1 min, y un ciclo final de 72°C durante 10 min, utilizando una temperatura de alineamiento de 48,3 °C.

Los productos de PCR de los fragmentos del gen *hdc* y *tdc* se visualizaron en un gel de agarosa al 3% y 1,5%, respectivamente, teñidos con bromuro de etidio como recomienda Sambrook y cols. (1989).

Los quesos fueron considerados positivos cuando al menos en 3 muestras de diferentes lotes se detectara la presencia del gen, y negativas cuando no fuera detectado en 5 muestras de lotes diferentes con 5 réplicas de cada lote.

### 3.7. Bibliografía

1. Anónimo. (1994a).-Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos madurados y procesados. Especificaciones.
2. Anónimo. (1994b).-NOM-113-SSA1-1994 Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
3. Anónimo (1994c). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
4. Anónimo. (1994d).-NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa
5. Anónimo. (1985). -NMX-F-209-1985. Alimentos. Lácteos. Queso Tipo Chihuahua. Foods. Lacteos. Chihuahua Type Cheese. Normas Mexicanas. Dirección. General de Normas.
6. Anónimo. (1981). -NMX-F-328-S-1981. Alimentos para humanos. Determinación de Cloruro de Sodio en margarina. Foods for humans -Determination of sodium chloride content in margarine. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
7. Anónimo (1978). NMX-F-066-S-1978. Determinación de Cenizas en Alimentos. Foodstuff Determination of Ashes. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
8. Anónimo. (1976).-NMX-F-098-1976. Determinación de Proteínas en Quesos. Method of Test for Protein in Cheese. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
9. Anónimo. (1970). NMX-F-099-1970. Método de Prueba para la Determinación de pH en Quesos Procesados. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
10. Api web [CD-ROM] BioMérieux. (2010).
11. AOAC (2005). Official Method 990.03. Protein (Crude) in Animal Feed, Combustion Method, in Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Edition (2005). Revision 1, 2006, Chapter 4, pp. 30-31. AOAC International, Arlington, VA.
12. AOAC (2002). Official Method 920.39. Crude Fat or Ether Extract: Animal Feeds. In AOAC Official Methods of Analysis, 17th edition: Revision 1. Horwitz, W., Ed.: AOAC International: Arlington, VA.
13. AOAC (2001). Official Method 998.09. Salmonella in Foods, Colorimetric Polyclonal Enzyme Immunoassay Screening Method with Rappaport-Vassiliadis Broth and Tetrathionate Broth (TECRA Salmonella VIA) 17th Edition. W. Horwitz (ed). Volume



1. Agricultural Chemicals, Contaminants and Drugs. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.
14. AOAC (2000). Official Method 995.22. Listeria in foods. Colorimetric polyclonal enzyme immunoassay screening method (TECRA Listeria Visual Immunoassay [TLVIA]). Chapter 17.10.06, pp. 152-155 In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 17th Edition. W. Horwitz. Volume 1. Agricultural Chemicals, Contaminants and Drugs. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.
15. AOAC (1997). Association of Official Analytical Chemists. AOAC. 1997. Histamine in sea food: Biological method. Sec. 35.1.30, Method 954.04. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., P.A. Cunniff (Ed.), p.14-15.
16. AOAC (1995). Official Method 926.08/935.42: moisture in cheese/ash of cheese. In: Official methods of analysis of AOAC international.16 ed. Gaithersburg. p. 58-59. v. 2.
17. Elsanhoty RM; Mahrous; Ghanaimy GA. (2009). Chemical, microbial counts and evaluation of biogenic amines during the ripening of egyptian soft domiati cheese made from raw and pasteurized buffaloes milk. International journal of dairy science.4 (2) p 80-90.
18. Espinoza-Pesqueira DM. (2010). Efecto de la aplicación de la alta presión hidrostática sobre la formación de aminas biógenas en dos quesos artesanos elaborados con leche cruda de cabra y oveja. Compendio de Tesis de Maestría, Departamento de ciencia animal y de los Alimentos, Universidad Autónoma de Barcelona.
19. Fernández M; Flores AB; Linares DM; Mayo B; Álvarez M. (2006). Early PCR detection of tyramine-producing bacteria during cheese production. Journal of dairy Resarch 73:318-321.
20. Fernández M; Del Río B; Linares DM.; Martín MC; Álvarez, M A. (2006). Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. J. Dairy Sci. 89, 3763–3769.
21. González-Martínez BE. (2005). Queso fresco como vehículo para microorganismos probióticos y su efecto sobre el crecimiento de Salmonella enteritidis var. Typhimurium, Compendio de Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

22. Hoffman C S y Winston F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli* Gene 57, 267-272.
23. Jung S; Rickert D A; Deak N; Aldin E D; Recknor LA; Johnson L.A; Murpy PA. (2003). Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. The American Oil Chemist's Society Num 12. p 1169-1173.
24. National Center for Biotechnology Information NCBI. (2011). Disponible:
25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
26. Pintado A.I; Pinho O; Ferreira I; Pintado M E; Gomes A; Malacata F X. (2008). Microbiological biochemical an biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. International dairy Journal.18:631-640.
27. Randazzo L; Torriani S; Akkermans A; De Vos W; Vaughan E. (2002). Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis Applied and Environmental Microbiology, 2 Vol. 68, p1882–1892.
28. Sambrook J; Fritsch E F; Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
29. Ventura, M., R. Reniero, and R. Zink. (2001). Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis*. *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined Multiplex-PCR approach. Appl. Environ. Microbiology. 67:2760-2765.

## CAPITULO IV

### CARACTERIZACIÓN DE QUESOS CHIHUAHUA

#### 4. Introducción

##### 4.1. Características físico-químicas

El queso chihuahua de acuerdo a los estudios recientes lo describen como un queso con características únicas de sabor y textura. Tiene un periodo corto de maduración (2 meses). Se puede considerar que la maduración del queso chihuahua inicia durante el periodo de oreado a una temperatura entre 4 y 27°C y se prolonga durante las semanas de almacenamiento a una temperatura de 10 a 20°C. (Van Hekken *et al.*, 2007; Tunick *et al.*, 2008).

El queso chihuahua suele presentar una consistencia semidura y rebanable, con escasa presencia de ojos. El color de este queso es amarillo pálido, y suele tornarse amarillo dorado cuando se madura (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008; Tunick *et al.*, 2008).

De manera general se pueden distinguir dos tipos de queso chihuahua el elaborado con leche no pasteurizada, producido generalmente en pequeñas queserías bajo condiciones artesanales, y el queso chihuahua elaborado con leche pasteurizada en queserías artesanales y a nivel industrial. Investigaciones realizadas en muestras de queso elaborados con leche con y sin tratamiento térmico reportan que existe una clara variación en el sabor del queso chihuahua (Lucey *et al.*, 2003).

Van Hekken y col. (2006) reportaron que el queso chihuahua elaborado en invierno presenta un menor contenido de grasa (22,5-25,0%) en comparación con el queso elaborado al final del verano (33,5-35,5%). Muchas de las características organolépticas de este queso como sabor, palatabilidad, textura, color y cremosidad de la pasta dependen del contenido de grasa.

Hay quienes sugieren que el queso chihuahua es una variante del queso cheddar, la principal diferencia entre estos quesos es que el queso chihuahua presenta una menor cantidad de humedad. (Gutiérrez Méndez y Nevárez Moorillón, 2009).

Otra característica distintiva del queso chihuahua es la proporción de grasa/proteína es de aproximadamente 1.2:1.0. Esta proporción es diferente a la de 1.3:1.0, que presenta el queso cheddar un queso con algunas similitudes.

#### **4.1.1 Calidad microbiológica**

La contaminación microbiana del queso puede proceder de distinta fuente como la leche y demás ingredientes utilizados para la elaboración, los utensilios y el área de trabajo, así como de los microorganismos utilizados para la coagulación y/o la maduración y el personal que labora en el proceso (Temelli *et al.*, 2006).

Es importante tener buenas prácticas higiénicas en la elaboración de quesos y corroborar que no contengan microorganismos patógenos que afectan la salud de las personas causando infecciones. Estos microorganismos generalmente son Enterobacteriáceas patógenas como *Salmonella* o *Escherichia coli*. Otros microorganismos que también pueden estar presentes en las muestras de quesos son el *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* por lo que se deben realizar estudios microbiológicos para asegurar la inocuidad del alimento.

Los estudios microbiológicos que marca la Norma Oficial Mexicana (NOM-113-SSA1-1994b) en quesos son la cuenta de bacterias coliformes, de este grupo, específicamente el contenido de *Escherichia coli*, la cual cuando está presente en los alimentos indica una contaminación directa o indirecta de origen fecal. También debe incluir la detección de la presencia de bacterias patógenas como *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Otros microorganismos que marca la Norma Oficial Mexicana es la cuenta de levaduras y mohos, estos crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos no ácidos que conservan humedad (Ray y Bhunia, 2008; Anónimo 1994a y 1985).

Son numerosos los reportes sobre la presencia de microorganismos contaminantes y algunas veces también patógenos en diferentes quesos elaborados en México por lo que es importante el análisis de la calidad microbiológica de los diferentes quesos chihuahua en especial, por la relación que tiene la flora como potencial fuente de microorganismos con enzima amino descarboxilasa.

Palacios (2006) estudió la microbiología del queso tipo Oaxaca elaborado con leche sin pasteurizar proveniente del Valle de Tulancingo Hidalgo México, encontró un alto contenido de bacterias mesófilas (7,63 Log UFC/g) y de coliformes (4,08 Log UFC/g) identificando *E.coli* en concentraciones de 3,6 Log UFC/g y de mohos y levaduras de 4,8 Log UFC/g.

Tunick y col, (2008) realizaron una investigación en quesos chihuahua elaborados con leche pasteurizada y sin pasteurizar, dando negativos en todos los quesos para *L. monocytogenes*, *E. coli O157: H7* y enterotoxina de *Staphylococcus aureus*.

Mientras que Perdomo (2010) analizó queso fresco “de prensa” elaborado con leche no pasteurizada en la ciudad de Veracruz donde encontró cuentas altas de mesófilos de 6,98 Log UFC/g y de coliformes de 6,30 Log UFC/g.

Es importante señalar que algunas cepas de microorganismos Gram negativos aislados en quesos mexicanos, se ha demostrado estos géneros pueden tener la capacidad de producir aminos biógenas.

## 4.2. Resultados y discusión

### 4.2.1 Descripción de las muestras analizadas

Se adquirieron ocho muestras de queso chihuahua de leche de vaca pasteurizada que se comercializan en la ciudad de Monterrey, N.L. México. Fueron adquiridos en marzo de 2011 y codificados con letras (de la **A** a la **H**), la información contenida en las etiquetas de cada producto se describen en la tabla 9.

**Tabla 9.** Datos de identificación de los quesos analizados

Código	Tipo de Queso	Fecha de adquisición	Fecha de Elaboración	Fecha de caducidad	Lote	Tipo de Empaque
<b>A</b>	Chihuahua	23/3/11	21/2/11	23/08/11	442	VACIO
<b>B</b>	Chihuahua	23/3/11	*	6/06/11	ODO40711111	VACIO
<b>C</b>	Chihuahua	23/3/11	*	26/05/11	1-056	PLASTICO
<b>D</b>	Chihuahua	23/3/11	21/2/11	23/08/11	423	VACIO
<b>E</b>	Chihuahua (Tipo)	23/3/11	*	15/06/11	QUO4511CO8 3:43	VACIO
<b>F</b>	Chihuahua	23/3/11	*	28/05/11	28 2801	VACIO
<b>G</b>	Chihuahua	23/3/11	*	05/06/11	066-8-P	VACIO
<b>H</b>	Chihuahua (Tipo)	28/3/11	*	10/06/11	040-17-90	VACIO

\*No especificado

#### 4.2.2. Resultados bromatológicos

Los resultados de los análisis bromatológicos y fisicoquímicos de los quesos se presentan en la tabla 10. Se observa que los quesos chihuahua tienen un promedio de humedad muy homogéneo entre 39,0 y 42,5%, así como el de proteína que oscila entre 20,5% a 23,6%, en contraste con los valores de grasa que varían entre un 20,0% a un 44,8%.

**Tabla 10.** Resultados del análisis físico-química al inicio de su vida de anaquel realizadas a las muestras de queso

QUESO	% Humedad	% de Nitrógeno Queso	% de Proteína Queso	% de Grasa	% de Cenizas (Materia mineral)	Na en mg 100g	pH	% de Nitrógeno amoniacal
A	40,0 ± 0,2	3,61±0,1	23,08±0,01	37,94 ±7,2	6,8±0,06	760±6	5,18 ±0,3	0,07±0,02
B	41,0 ±0,2	3,69±0,4	23,53 ±0,01	37,90± 1,2	6,5±0,05	608±4	5,34 ±0,2	0,03±0,05
C	42,5 ±0,5	3,90±0,8	24,86 ±0,01	33,44 ±3,6	6,6±0,06	967±8	5,40 ±0,1	0,09±0,01
D	41,5±0,5	3,40±0,2	21,28 ±0,01	39,98 ±1,5	7,1±0,20	806±6	5,40 ±0,2	0,07±0,02
E	42,0 ±0,5	3,51±0,0	22,39 ±0,01	44,84 ± 1,4	8,0±1,00	585±8	5,13 ±0,2	0,06±0,01
F	39,0 ±0,2	3,65±0,2	23,29 ±0,01	30,12 ±6,4	8,2±1,00	783±6	5,64 ±0,1	0,05±0,01
G	39,5 ±0,5	3,22±0,1	20,55 ±0,01	38,84 ± 6,0	7,3±0,30	939±9	5,58 ±0,2	0,06± 0,01
H	39,5 ±0,5	3,25±0,1	20,70 ±0,01	20,03±2,4	6,5±0,07	469±4	5,47 ±0,2	0,05±0,01

En la concentración de sodio se encuentran variaciones desde 469 mg/100g hasta 967mg/100g y el pH se encontró entre 5,18 y 5,64. En relación al % de nitrógeno amoniacal se encuentra entre 0,03 a 0,09 %, donde el queso C, presentó los valores más altos indicando la presencia de una mayor proteólisis.

#### 4.2.3. Comparación de los resultados encontrados y lo declarado en etiqueta

Los resultados encontrados se contrastaron con lo declarado en las etiquetas de los productos, (tabla 11) se encontró que en algunos casos que el contenido es superior a lo reportado mientras que en otros es inferior. En las etiquetas de los productos, solo el 62,50% incluye el contenido de proteína y el 50% el de grasa

**Tabla 11.** Relación de entre lo encontrado y lo declarado de la concentración de sodio, % de proteína y % de grasa

QUESO	PROTEÍNA		SODIO		GRASA	
	Declarado* %	Encontrado %	Declarado* mg/100g	Encontrado mg/100mg	Declarado* %	Encontrado %
A	**	23,08	785,7	760	**	37,94
B	**	25,53	**	608	**	37,90
C	22,0	24,86	665	967	26	33,44
D	28,5	21,28	785	806	32	39,98
E	22,0	22,39,	884	585	32	44,84
F	23,5	23,29	**	783	29,9	30,12
G	**	20,55	**	939	**	38,84
H	**	20,70	**	469	**	20,03

\*Fuente: etiquetas de las muestras de queso

\*\*No declarado

En el contenido de proteínas las variaciones van desde un 0,9% hasta un 34% como en el queso D que declara contener un 28,5% y al analizarlo solo se encontró 21,28%. En relación a la concentración de sodio al comparar se observan variaciones donde el contenido es inferior en un 33,8% mientras que en otro queso se encontró que el contenido era superior en un 45%. En relación al porcentaje de grasa el queso F concuerda con lo declarado y el resto de las muestras presentan valores superiores a lo reportado de un 24% a un 40%.

La norma NMX-F-209-1985 de quesos chihuahua marca los lineamientos que deben tener los quesos chihuahua (tabla 12). Los quesos analizados cumplen las especificaciones de la NOM-F209-1985 en los parámetros de humedad y pH; los quesos D, G, H presentan concentraciones inferiores de proteína a lo que marca la norma, entre un 3,2 a 6,6%.

**Tabla 12.** Contraste de las determinaciones de proteína, grasa, humedad, cenizas, sólidos totales y pH con las Norma NMX-F-209-1985 de quesos chihuahua.

Indicador	NMX-F 209		QUESOS							
	Min	Max	A	B	C	D	E	F	G	H
Proteína %	≥ 22	-	23,08	23,53	24,86	21,28	22,39	23,29	20,55	20,70
Humedad %	-	45	40,00	41,00	42,5	41,5	42,0	39,0	39,5	39,5
Grasa %	≥ 26	-	37,94	37,90	33,44	39,98	44,84	30,12	38,84	20,03
pH	5,0	6,5	5,18	5,34	5,40	5,40	5,13	5,84	5,58	5,47
Cenizas totales%	-	6,5	5,38	5,08	6,69	5,22	5,89	5,41	6,20	5,47
Sólidos totales %	55	-	60,0	59,00	57,5	58,5	58,0	61,0	60,5	6,5

En relación al indicador de grasa butírica la norma marca como mínimo 26% y la mayoría de los quesos cumplen con esta especificación, solo el queso H está fuera de este rango. En relación con el porcentaje de cenizas total solo la muestra C está por encima de lo establecido. Las muestras de quesos chihuahua presentaron concentraciones de proteína entre 20,55 a 24,86% donde los resultados de tres muestras de queso estaban por debajo de lo que marca la NMX-F-209. Investigaciones realizadas por Tunick y col, (2008) y Van Hekken y col, (2006) en quesos chihuahua elaborados en esa misma región reportaron porcentajes 23-27% y 24-29% respectivamente cifras superiores a este estudio.

En estudios realizados por el Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados, A.C en 2009. (COFOCALEC) en quesos chihuahua que se comercializan en Guadalajara Jal y en el Estado de Chihuahua reportaron porcentajes muy variados presentando valores de 17,50 a 26,37% y de 15,00 a 29,89% respectivamente.

El parámetro de humedad de las muestras está dentro del rango que marca la NMX-F-209 y comparando con los resultados en quesos chihuahua reportados por Tunick *et al.*, (2008) son cifras ligeramente inferiores a los reportados en esta investigación.



Las pequeñas industrias que producen quesos chihuahua principalmente las de las colonias de Menonitas, de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua no descreman la leche que utilizan para la elaboración de estos quesos por lo que se han encontrado muestras de queso hasta con un 45% de grasa lo que le da las características típicas de este queso como los son el color amarillo dorado y cremosidad de la pasta (Gutiérrez-Méndez y Nevárez Moorillón, 2009).

En estudios realizados en quesos chihuahua elaborados con leche pasteurizada de la región de Cuauhtémoc Chihuahua por Van Hekken y Farkye., (2003) reportaron porcentajes de grasa que van de 21 a 30 % y más tarde Tunick y col, (2008) reportaron porcentajes de 30 a 34% en quesos elaborados con leche pasteurizada y sin pasteurizar. En este estudio se encontraron porcentajes que oscilan de 20,03 a 44,84%. Encontrando un valor promedio de 35,38%. El queso E que es un queso imitación chihuahua presentó un alto porcentaje de grasa (44%) puede deberse que para su elaboración utilizan grasa vegetal (la etiqueta lo declara). Cifras muy superiores a lo que marca la Norma  $\geq 28\%$  (Anónimo 2011). En estudios realizados por el COFOCALEC en muestras de queso chihuahua elaborados en diferentes municipios del Estado de Chihuahua reportan porcentajes que van de 21,11% hasta 36,39% y los estudiados en los municipios de Guadalajara Jalisco, valores de 21,2% a 36,97% cifras cercanas a las reportadas en este estudio.

Las muestras de quesos chihuahua estudiados, fueron elaborados en diferentes ciudades y los estudios físico químicos demuestran concentraciones diferentes de sodio, proteína y tres de las muestras declaraban que utilizaron grasa vegetal. La concentración de aminas biógenas difiere mucho entre los diferentes quesos ya que depende como se ha indicado anteriormente de diferentes factores.

La investigación realizada por Bejar-Lio., (2010) reportó que los quesos elaborados en el Estado de Chihuahua presentaban rangos de pH de 5,0 a 5,5. En esta investigación 5 de los quesos estudiados fueron elaborados por empresas del Estado de Chihuahua donde encontramos rangos de pH entre 5,18 a 5,58 coincidiendo que lo encontrado por este autor. Los valores de pH de las muestras de queso estudiadas variaron desde 5,13 hasta 5,64 (Tabla 12).

La diferencia en el pH puede ser pequeña, pero, junto con otros factores, pueden influir en la producción de aminas biógenas (Bejar-Lio, 2010). Estudios realizados por Linares *et al.*,

(2009), reportaron que los genes que codifican para las enzimas amino decarboxilasa pueden ser inducida a pH bajo. Estos autores estudiaron cepas de *Enterococcus durans* en alimentos identificando que al disminuir el pH se activaba significativamente la enzima tirosina descarboxilasa, relacionándose con un aumento en la producción de tiramina mientras que estos genes no se expresaban a pH neutro.

Un pH bajo es un parámetro clave que representa un riesgo potencial junto con otros factores para la acumulación de aminas biógenas en el producto final. Sin embargo, es difícil realizar cambios sobre este parámetro, ya que es inherente al proceso de fermentación.

#### 4.2.4 Calidad microbiológica de los quesos analizados.

En la tabla 13 se presentan los resultados de la calidad microbiológica de los quesos, se incluye la cuenta de mesófilos aerobios, coliformes, hongos y levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL). En las muestras analizadas no se detectó la presencia de *Salmonella* ni *Listeria*.

**Tabla 13.** Calidad microbiológica de quesos chihuahua.

<b>Quesos</b>	Cuenta total de bacterias* Log UFC/g	Bacterias coliformes totales Log UFC/g	Cuenta de <i>Lactobacillus</i> (BAL) Log UFC/g	Hongos y Levaduras Log UFC/g
<b>A</b>	3,7 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,01 <sup>c</sup>	9,0 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,3
<b>B</b>	3,1 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,8 ± 0,1
<b>C</b>	3,1 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,3 ± 0,02 <sup>c</sup>	8,3 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,0 ± 0,1
<b>D</b>	3,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,01 <sup>c</sup>	8,6 ± 0,04 <sup>e</sup>	0,7 ± 0,2
<b>E</b>	3,7 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,01 <sup>b</sup>	7,6 ± 0,03 <sup>e</sup>	0,6 ± 0,3
<b>F</b>	3,4 ± 0,03 <sup>c</sup>	3,3 ± 0,01 <sup>cd</sup>	8,8 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,2
<b>G</b>	3,8 ± 0,02 <sup>e</sup>	3,4 ± 0,02 <sup>d</sup>	7,8 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,2 ± 0,2
<b>H</b>	3,8 ± 0,02 <sup>de</sup>	3,3 ± 0,03 <sup>cd</sup>	7,8 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,6 ± 0,1

\*Mesófilos aerobios

\*\*Subíndices diferentes indican diferencias significativa entre la marcas de quesos.

Se observa la cuenta total de bacterias en un rango de 3,1 a 3,80 Log UFC/g, en relación a las bacterias coliformes totales se presentan en un rango de 2,6 a 3,4 Log UFC/g y se encuentra diferencia significativa entre las diferentes marcas.

Como era de esperarse al ser un producto madurado, los quesos presentaban un contenido de BAL elevado, en un rango de 7,6 l a 9,0 Log UFC/g. Las levaduras presentan un rango de 0,2 a 1,0 Log, los contenidos de estos microorganismos son inferiores a lo que establece la normatividad vigente, por lo que los productos cumplen con las especificaciones para este tipo de queso.

En relación a la cuenta de total de bacteria las cifras encontradas fueron muy inferiores a las reportadas por Tunicks y col, (2008) en quesos chihuahua con leche pasteurizada (6,08 a 8,07 Log UFC/g), y a los estudios realizados por Díaz Cinco y col, (1992) de 6,08 a 8,76 Log UFC/g.

Los resultados mostrados en la tabla 14 de la cuenta de *Lactobacillus* realizada a las muestras de quesos variaron de 7,00 a 9,00 Log UFC/g. y se presenta diferencia significativa entre las diferentes marcas. Estos valores son superiores en los encontrados por Contreras y col, (2007) quien realizó estudios en queso parmesano (queso madurado elaborado en Venezuela con maduración de 8 semanas) el cual presenta valores de *Lactobacillus*, entre 5,74 y 6,93 Log UFC/g, cifras inferiores a las encontradas en este estudio.

En un estudio realizado por Romero-Castillo y col, (2009) en diferentes marcas de queso crema obtenidos de queserías del estado de Chiapas elaborados con leche pasteurizada y sin pasteurizar encontraron un alto número de bacterias coliformes fecales que fluctuaron entre 6,66 y 7,65 Log<sub>10</sub> UFC/g valores por arriba de los estándares microbiológicos que marca la Norma Mexicana NOM- 113-SSA1- 1994. Además, en estos mismos quesos se detectó *E. coli* en todos los quesos elaborados por leches pasteurizadas y sin pasteurizar y se encontró *Salmonella spp* en uno de los queso elaborados con leche no pasteurizada.

Díaz-Cinco y col, (1992) realizaron investigaciones microbiológicas en quesos chihuahua que fueron mantenidos a 5°C por 12 días reportando contenidos de 8,34 Log UFC de mesófilos aerobios; 7,36 log UFC/g de hongos, levaduras y 6,54 Log UFC/g de *Staphylococcus aureus*. Además aislaron 8 especies bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aeruginosa*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*. A las muestras también se les realizaron cultivos para *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Shigella* dando negativo en todos los quesos.

Estudios realizados por Tunick y col, (2008) en quesos chihuahua elaborados con leche sin pasteurizar reportaron una cuenta de *Lactobacillus spp* y *Lactococcus* de 7,10 a 8,93 Log UFC/g y en quesos con leche pasteurizada una cuenta de 3.42 a 7.24 log UFC/g.

La cuenta de bacterias coliformes también fueron inferiores a los datos reportados en quesos chihuahua por Díaz-Cinco *et al.*, (1992) donde reportaron cuentas de coliformes totales de 5,0 y 6,0 Log UFC/g y de hongos y levaduras de 4,0 a 6,0 Log UFC/g cifras muy superiores a las encontradas en el presente estudio. Sin embargo, los resultados de ausencia de patógenos coinciden en ambos estudios.

Así mismo coincide con los resultados presentados por Saltijeral y col, (1999) donde analizaron la presencia *L. monocytogenes* en 40 diferentes tipos de quesos que se comercializan en la ciudad de México, no se encontró este microorganismo en el queso chihuahua. Aunque el microorganismo se puede encontrar en este queso como lo demuestran Solano-López y Hernández-Sánchez, (2000) al inocular *L. monocytogenes* a la leche antes de elaborar quesos chihuahua, encontraron que las bacterias sobrevivieron al procesamiento y permanecieron viables hasta 6 semanas en el queso.

### **4.3. Conclusiones**

Existen un bajo control de calidad, evidenciado por la variación entre lo declarado y lo encontrado en los análisis bromatológicos de los productos terminados, quizás debido a una diferente estandarización de los procesos y/o de la leche utilizada como materia prima.

No hay un estricto cumplimiento con la normatividad en los contenidos de proteína, grasa y cenizas.

Los análisis microbiológicos de los quesos muestran que estos cumplen con las especificaciones microbiológicas de la normatividad mexicana para este tipo de productos.

Los quesos no presentaban bacterias de riesgo para la salud de los consumidores.

#### 4.4. Bibliografía

1. Anónimo. (2011). NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema producto leche-alimentos-lácteos-alimento lácteo regional-queso cotija artesanal madurado-denominacion, especificaciones y métodos de prueba.
2. Anónimo. (1994a). Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos madurados y procesados. Especificaciones.
3. Anónimo. (1994b).-NOM-113-SSA1-1994 Método para la cuenta microorganismos coliformes totales en placa.
4. Anónimo. (1985). NMX-F-209-1985. Alimentos. Lácteos. Queso Tipo Chihuahua. Foods. Lacteos. Chihuahua Type Cheese. Normas Mexicanas. Dirección. General de Normas.
5. Béjar-Lío GI. (2010). Dinámica de la microbiota en el proceso de elaboración del queso Chihuahua. Compendio de Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua.
6. Cervantes E F; Villegas G A; Cesín V A; Espinoza O A. (2008). Los Quesos Mexicanos Genuinos. Patrimonio que debe rescatarse. Universidad Autónoma de Chapingo y Mundi prensa México.
7. Consejo para el fomento de la calidad de la leche y sus derivados, A.C. (COFOCALEC). <http://cofocalec.org.mx>
8. Contreras M; Izquierdo P; Allara M; García A; Torres G. Y; Céspedes, E. (2007). Determinación de aminas biógenas en quesos madurados. Revista científica Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad del Zulia 17 (1):89-95.
9. Díaz-Cinco M.E; Fraijo O; Grajeda P; Lozano-Taylor X; González de Mejía E. (1992). Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationship to histamine and tyramine, J. Food Sci., 57, 355.
10. Fernández-García E; Tomillo J; Núñez M. (1999). Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. Int. Journal. Food Microbiology. 52, 189–196.

11. Gutiérrez-Méndez N; Nevarez-Moorillón G. V. (2009). Queso Chihuahua: historia de un queso mexicano. *Carnilac Industrial* 25: (5) 27-33.
12. Linares D. M; Fernández M; Martín MC.; Álvarez M A. (2009). Tyramine biosynthesis in *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine concentration. *Microbiology Biotechnology*.2, 625–633.
13. Lucey J A; Johnson M E; Horne D S. (2003). Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science* 86, 2725-2743.
14. Palacios Vargas S. (2006). Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el Valle de Tulancingo Hidalgo. Compendio de Tesis Doctoral, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
15. Perdomo González N. (2010). Evaluación de la calidad microbiológica de leche y queso fresco “de prensa” artesanal elaborado en el Municipio de Jesús Carranza, Veracruz, México. Compendio de Tesis Doctoral, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, México.
16. Ray B; Bhunia, A. (2008). Bioquímica de algunas características favorable en Fundamentos Microbiología de los Alimentos. 4ta edición McGrawHill. p77-79.
17. Romero-Castillo PA; Leyva- Ruelas G, Cruz-Castillo JG; Santos-More A. (2009). Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical mexicanos de la región de Tonalá, Chiapas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 8, No. 1.111-119.
18. Saltijeral J; Álvarez V; García B. (2007). Presence of *Listeria* in mexican cheeses. *Journal of Food Safety*. Vol 19, Issue 4, p 241–247.
19. Solano-López C; Hernández-Sánchez H. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes*. During the Manufacture and Ripening of Manchego and Chihuahua. *Int J Food Microbiol*. 2000 Dec 5; 62 (1-2):149-53.
20. Temelli S; Anar S; Sen C; Akyuva P. (2006). Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. *Food Control*, 17, 856–861.
21. Tunick M H; Van Hekken D J; Molina-CorraL F J; Tomasula P T; Call J; Luchansky J; Gardea A A. (2008). Queso Chihuahua: manufacturing procedures composition,

- protein profiles, and microbiology. *International Journal of Dairy Technology*. Vol. 61, p 62-69.
22. Van Hekken D L M. H; Tunick P M; Tomasula F. J; Molina-Corral A. A; Gardea. (2007). Mexican Queso Chihuahua: Rheology of fresh cheese. *Int. Journal Dairy Technolgy*. 60:5–12.
  23. Van Hekken D M; Drake F; Molina V; Guerrero P; Gardea A A. (2006). Mexican Chihuahua Cheese: Sensory profiles of Young Cheese. *Journal Dairy Sci*. 89:3729-3738.
  24. Van Hekken D L; Farkye N Y. (2003). Hispanic cheese: the quest for queso. *Food Technology* 57 32–38

## CAPÍTULO V

### MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE AMINAS BIÓGENAS

#### 5. Introducción

Los métodos para investigar la presencia de microorganismos productores de aminas biógenas se basan en utilizar medios de cultivo diferenciales que contienen el aminoácido precursor de la amina biógena y un indicador de pH para detectar la acumulación de la amina a investigar. El medio de cultivo tendrá un cambio de color si hay bacterias con la enzima amino descarboxilasa. Estos métodos requieren primero el aislamiento y desarrollo de los microorganismo productores de aminas biógenas en medios enriquecidos y posteriormente el cultivo en medios específicos para detectarlos.

La mayoría de los medios específicos son preparados con un indicador de pH como púrpura de bromocresol (Bover-Cid y Holzapel., 1999; Niven *et al.*, 1981; Moeller y Clark, 1954). Todos tienen como base una fuente de carbono, nitrógeno y vitaminas (glucosa, peptona, extracto de levadura o de carne, NaCl, y fosfato de piridoxal) utilizando el aminoácido precursor de la amina a investigar (histidina, tirosina, lisina, triptófano).

Estos medios de cultivo han sido utilizados para detectar bacterias productoras de histamina y tiramina. Joosten y Northolt, (1989) realizaron la investigación en muestras de quesos y Maijala y col, (1993) en productos cárnicos.

Algunos investigadores (Rodríguez-Jerez *et al.*, 1994; Roig-Sagués *et al.*, 1996) han reportado reacciones falsa positivas, que puede deberse a la formación de algún componente alcalino o falsos negativos por cambios en el pH del medio a causa de las bacterias ácido láctico.

#### 5.1- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 5.1.1. *Microorganismos con enzimas HDC y TDC.*

Los quesos seleccionados se sembraron en medios de cultivo selectivos para obtener bacterias Gram positivas y Gram negativas, las cuales se analizaron en su capacidad para formar histamina y tiramina.



### 5.1.2. Bacterias Gram positivas con las enzimas HDC y TDC en medios selectivos.

En la tabla 14 se encuentran los resultados de las bacterias desarrolladas en el agar MRS y después inoculadas en el medio específico para detectar bacterias con las enzimas HDC y TDC en cuatro momentos de la vida de anaquel. Se puede observar que al inicio de la vida de anaquel solo se detectaron bacterias con la enzima TDC en una marca de queso (B). Cuatro semanas después, se detectó la presencia de bacterias con enzima HDC en el queso (G) y bacterias con la enzima TDC en 3 quesos más (A, C y F). A los dos meses, se detectó la enzima HDC en otro queso (A) y bacterias con la enzima TDC en un queso más (G). Al final de la vida de anaquel solo las muestras A, y G dieron positivo para las dos enzimas HDC y TDC, mientras que en 4 marcas de los quesos (B, C, D y F) se detectaron bacterias con la enzima TDC. Los quesos E y H no mostraron resultados positivos para los microorganismos con las enzimas investigadas en ningún de los tiempos analizados.

**Tabla 14.** Quesos que contienen bacterias fermentativas con la enzima histidina y tirosina descarboxilasa.

		MEDIO ESPECIFICO							
		28/MARZO/2011		28/ABRIL 2011		30/MAYO/ 2011		30/JUNIO 2011	
QUESOS	Bacterias productoras	Bacterias productoras		Bacterias productoras		Bacterias productoras		Bacterias productoras	
	de:	de:		de:		de:		de:	
	Histamina    Tiramina	Histamina    Tiramina	Histamina    Tiramina	Histamina    Tiramina	Histamina    Tiramina	Histamina    Tiramina			
<b>A</b>	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>B</b>	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
<b>C</b>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
<b>D</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
<b>E</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>F</b>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
<b>G</b>	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>H</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>Control</b>									
<i>L.30a</i>	(+)		(+)		(+)		(+)		(+)
<i>L.brevis</i>		(+)		(+)		(+)		(+)	(+)

El incremento en la detección de bacterias positivas con los medios específicos se presenta en la figura 6, se observa como al inicio del almacenamiento solo el 12,5% de los quesos

presentaba enzima TDC y ninguno la enzima HDC y al final de su vida de anaquel en el 25% se detectó la presencia de la enzima HDC y el 75% presentó la enzima TDC.

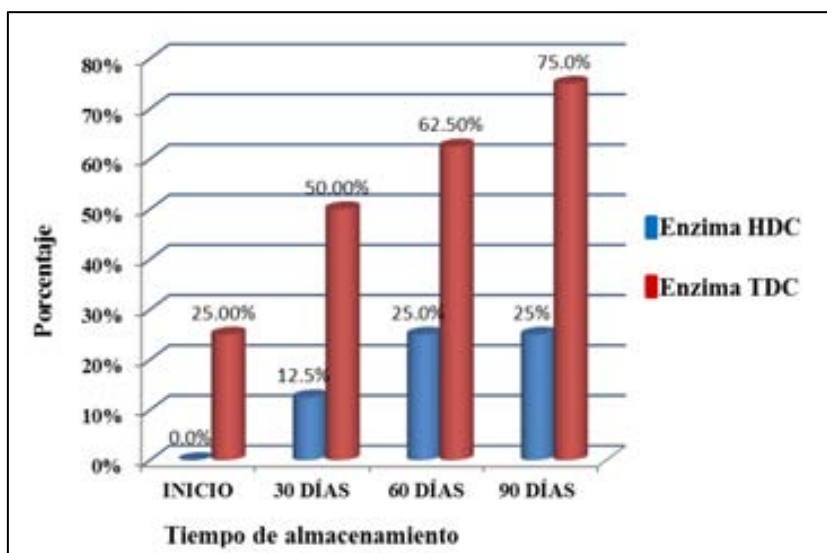


Figura 6. Detección de bacterias Gram (+) con las enzimas HDC y TDC en quesos chihuahua en diferentes tiempos.

### 5.2.3. Bacterias Gram negativas con las enzimas HDC y TDC en medios selectivos.

No se detectaron bacterias Gram (-) con enzimas HDC y TDC y por ende la capacidad de producir histamina y tiramina respectivamente en las diferentes colonias aisladas de cada uno de los 8 quesos. Las colonias desarrolladas se inocularon en el medio selectivo teniendo resultados negativos para las enzimas en los cuatro tiempos analizados.

Marino y col, (2000) realizaron estudios en quesos blue-veined elaborados en Italia, aislando diferentes cepas de Enterobacteriaceas (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Klebsiella*) donde realizaron cultivos para detectar la actividad amino descarboxilasa de cada cepa utilizando el medio de cultivo de Niven y determinando la concentración de las diferentes aminas por cromatografía (HPLC). Encontrando altas concentraciones de cadaverina y putrescina y muy bajas concentraciones de histamina y tiramina.

**5.2.4-Identificación bioquímica: Método API-CH de cepas positivas con la enzima HDC y TDC.**

De las bacterias Gram (+) inoculadas en los medios de cultivo selectivo que dieron resultados positivos a las enzimas HDC y TDC al final de la vida de anaquel se identificaron los microorganismos presentes por medio del sistema bioquímico API 50 CH de Biomereux, las bacterias se identificaron hasta nivel de especie. Los resultados encontrados se presentan en la tabla 15.

El microorganismo que se encontró en mayor cantidad en quesos fue el *L. pentosus* (3 diferentes marcas) mientras que el *L. rhamnosus* se encontró en 2 marcas. El queso B dio positivo al medio específico, pero el microorganismo no pudo ser cultivado de nuevo para su identificación en las pruebas bioquímicas para el género *Lactobacillus*.

**Tabla 15.** Identificación bioquímica de cepas de *Lactobacillus* identificados como productores de histamina y tiramina

Lactobacillus con enzimas		
Queso	HDC	TDC
<b>A</b>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pentosus</i> <i>L. plantarum</i>
<b>B</b>	Neg	No crecimiento
<b>C</b>	Neg	<i>L. pentosus</i>
<b>D</b>	Neg	<i>L. lactis sub lactis</i>
<b>E</b>	Neg	Neg
<b>F</b>	Neg	<i>L. rhamnosus</i>
<b>G</b>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<b>H</b>	Neg	Neg

Diferentes investigaciones indican que algunas bacterias lácticas en quesos son productoras de histamina y tiramina (Burdychova y Komprda., 2007; Stratton 1992). Principalmente se han reportado como productora de histamina las especies: *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L.*

*plantarum*, *L. helveticus* (Izquierdo *et al.*, 2003) y como productora de tiramina. *L. brevis* (Joosten y Northolt., 1989).

La formación de histamina en quesos ha estado relacionado también con bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB), principalmente *Lactobacillus curvatus* (Burdychova y Komprda., 2007; Novella-Rodríguez *et al.*, 2004) y con tiramina *Lactococcus lactis lactis* (González de Llano., 1998).

Burdychova, (2007) investigó histamina y tiramina en quesos Dutch-type semi-duro reportando que las bacterias relacionadas con la formación de estas aminas fueron en su mayoría *Enterococcus* y *Lactobacillus*, estas bacterias fueron utilizadas como iniciadoras, donde la producción de tiramina relacionada con estas cepas presentó un aumento en los 110 días de almacenamiento.

En esta investigación el 25% de las muestras de quesos chihuahua dieron positivo en el medio selectivo para identificar la enzima histidina descarboxilasa donde además este resultado se confirmó por cromatografía (HPLC) donde el 37,5% de las muestras al final de la vida de anaquel presentaron histamina.

Espinosa Pesqueira (2010) investigó en quesos elaborados con leche de cabra, bacterias productoras de aminas biógenas identificando a las especies *Lactobacillus lactis subsp lactis* y *Lactobacillus plantarum* como bacterias productoras de tiramina.

Los quesos pueden ser una matriz ideal para la producción de aminas biógenas, uno de los factores es la presencia de microorganismo con enzimas amino descarboxilasa que pueden estar presentes en leche. Los quesos madurados contienen mayores concentraciones de aminas que los quesos frescos, ya que los madurados requieren cierto tiempo y temperatura para su fermentación donde además participan los microorganismos utilizados como iniciadores (Roig-Sagués *et al.*, 2002; Schneller *et al.*, 1997, Días-Cinco *et al.*, 1992).

Además existen estudios donde cepas utilizadas como cultivos iniciadores han sido reportadas con actividad tirosina e histidina descarboxilasa (Burdychova y Komprda, 2007; Calles-Enríquez *et al.*, 2010).

Coton y Coton, (2004) demostraron que la formación de tiramina no es exclusiva de una especie, sino que tiene relación con diferentes microorganismos con enzimas específica de tirosina descarboxilasa.

Resultados previos confirman que la pasteurización de la leche reducen la presencia bacterias y por lo tanto la producción de aminas biógenas en los quesos, este proceso disminuye las bacterias con enzimas amino descarboxilasas como las enterobacteriáceas y enterococos (Elsanholy *et al.*, 2009; Ordoñez *et al.*, 1997; Marino *et al.*, 2000).

Joosten & Northolt, (1987) atribuyen esta diferencia a que el cofactor de las enzimas amino descarboxilasas el pirofosfato de piridoxal es susceptible al calor, el cual es indispensable para la función de estas enzimas.

La concentración de aminas biógenas puede diferir entre los diferentes quesos ya que depende como se ha indicado anteriormente de diferentes factores, como la calidad de la materia prima, y la presencia cepas utilizados como iniciadoras o la presencia de microorganismos contaminantes durante su elaboración con actividad amino descarboxilasa.

### **5.3. Conclusión**

En los quesos analizados se encontraron bacterias con enzimas productoras de aminas biógenas.

Al final de la vida de anaquel se incrementa la cantidad de muestras positivas a enzimas productoras de histamina y tiramina.

La especie de *Lactobacillus* que presentaron enzima histidina descarboxilasa fue *L. pentosus*.

Las especies de *Lactobacillus* que presentaron enzima tirosina descarboxilasa fueron *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. lactis sub lactis*, *L. rhamnosus*.

Una cepa de *L. pentosus* presentó las dos enzimas HDC y TDC.

#### 5.4 BIBLIOGRAFÍA

1. Api web [CD-ROM] Bio Mérieux. 2010.
2. Bover-Cid S; Holzapfel W H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Internacional Journal of Food Microbiol* 53:33–41.
3. Burdychova R; Komprda T. (2007) Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol*; 276(2):149-55.
4. Calles-Enríquez M; Eriksen B. H; Andersen P. S; Rattray F. P; Johansen A. H; Fernández M; Ladero V; Álvarez M A. (2010). Sequencing and transcriptional analysis of the *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: actors that affect differential *hdc A* expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6231-623.
5. Coton M; Coton E; Lucas P; Lonvaud A. (2004). Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiology* Vol. 21, p 125-130.
6. Díaz-Cinco M.E; Fraijo O; Grajeda P; Lozano-Taylor X; González de Mejía E. (1992). Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationship to histamine and tyramine, *J. Food Sci.*, 57, 355.
7. Elsanhoty RM; Mahrous; Ghanaimy GA. (2009). Chemical, microbial counts and evaluation of biogenic amines during the ripening of egyptian soft domiati cheese made from raw and pasteurized buffaloes milk. *International journal of dairy science.* 4 (2) p 80-90.
8. Espinoza-Pesqueira DM. (2010). Efecto de la aplicación de la alta presión hidrostática sobre la formación de aminas biógenas en dos quesos artesanos elaborados con leche cruda de cabra y oveja. Compendio de Tesis de Maestría, Departamento de ciencia animal y de los Alimentos, Universidad Autónoma de Barcelona.
9. González de Llano D, Cuesta P, Rodríguez A. (1998). Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Lett Appl Microbiol.* 26(4):270-4.
10. Izquierdo P; Allara M; Torres G; García A. (2003). Queso madurado manchego, parmesano y de año. *Revista científica FCV.* Vol. XIII No 6 p431-435.

11. Joosten H M; Northolt MD. (1989). Detection, growth, and amine-producing capacity of Lactobacilli in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:9:2356-2359.
12. Joosten H.M; Stadhouders J. (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. Decarboxylative properties of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.*, 41: 247-258.
13. Marino M; Maifreni M; Moret S; Rondini. (2000). The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology*, p169 y173.
14. Moeller V; Clark D.S. (1954). Distribution of aminoacid decarboxylases in Enterobacteriaceae. *Acta Pathol, Microbiol.Scand.*35, 259-277.
15. Niven C.F; Jeffrey M.B; Corlett D.A. (1981). Differential plating medium for quantitative detection of histamine forming bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 321–322.
16. Novella-Rodriguez S; Veciana-Noges MT; X Roig-Sagues A; Trujillo-Mesa A J; Vidal-Corou C. (2004). Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat from pasteurized and raw milk. *Journal of dairy research*. Vol. 71-02 p245-252.
17. Ordoñez A; Ibañez F; Torre P; Barcina Y. (1997). Formation of biogenic amines in Adiazábal ewe's milk cheese: effect of ripening, pasteurization, and starter. *Journal of Food Protection* 60 (11): 1371–1375.
18. Rodríguez-Jerez J; López-Sabater EI; Roig-Sague's A X; Mora-Ventura M T. (1994). Histamine, cadaverine and putrescine forming bacteria from ripened Spanish semipreseeded anchovies. *Journal of Food Science*. Vol 59/5, P 998–1001.
19. Roig-Sagués A X; Molina AP; Hernández-Herrero M M. (2002). Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*, 215: 96–100.
20. Roig-Sague's A X; Hernández-Herrero M M; López-Sabater E I; Rodríguez-Jerez, J.J; Mora-Ventura MT. (1996). Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened Salchichon, a Spanish cured sausage. *Journal of Food Protection*. Volume 59, pp. 516-520.

21. Schneller R; Good P; Jenny M. (1997). Influence of pasteurized milk, raw milk and different ripening cultures on biogenic amine concentrations in semi-soft cheeses during ripening. *Z Lebensm Unters Forsch A* 204:265-272.
22. Stratton J E; Hutkins R W; Sumner S S; Taylor S L. (1992). Histamine and histamine-producing bacteria in retail Swiss and low-salt cheeses. *Journal Food Prot.* 55: 435-439.



## CAPITULO VI

### CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA Y TIRAMINA POR HPLC

#### 6. Introducción

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica aprobada por la Association of analytical chemists (AOAC) en los Estados Unidos fue establecido como el método oficial para la determinación de histamina en alimentos (AOAC, 1997). Es la cromatografía más utilizada para cuantificar aminas biógenas en quesos (Rohani *et al.*, 2013; Adel y Abdel-Moamen, 2010; Standarová, *et al.*, 2010; Nalguin *et al.*, 2008; Aygün *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 1985).

Para la determinación de aminas por HPLC, se requiere realizar extracción, purificación y derivatización de productos y al final una detección por luz ultravioleta (UV) o por fluorescencia. La detección por luz ultravioleta es menos sensible para la histamina (Peng *et al.*, 2008) por lo que la mayoría de los investigadores utilizan detección por fluorescencia.

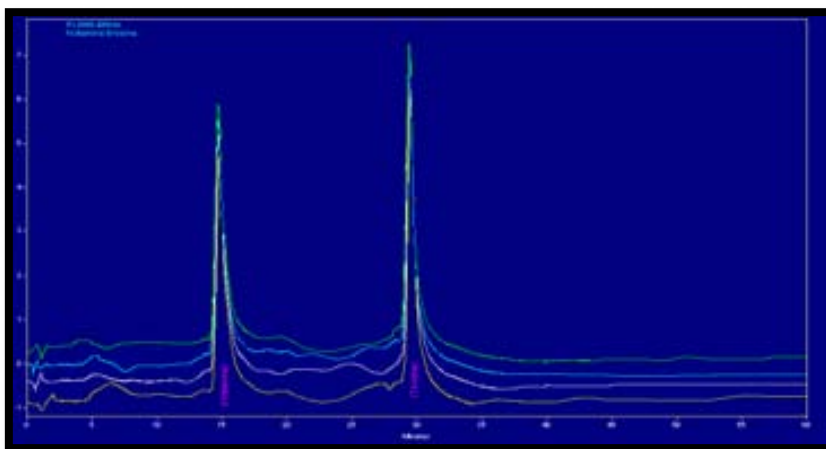
Por esta técnica puede obtenerse el espectro completo de las aminas biógenas en una sola operación. Se utiliza una columna de fase reversa para la separación de los analitos, la derivatización se puede realizar con cloruro de dansilo que reacciona con la amina, absorbiendo el derivado a 254 nm (*et al.*, 2010; Stradorova *et al.*, 2009; Innocent *et al.*, 2007; Smela, *et al.*, 2003; Eerola *et al.*, 1993) o con o-phthaldialdehído (OPA) (Peng *et al.*, 2008; Yildirim, *et al.*, 2007; Smela *et al.*, 2003; Kutlán *et al.*, 2002) que produce un derivado fluorescente con una longitud de onda de excitación de 340 nm y una emisión de 430 a 450 nm.

En este estudio se utilizó una columna de fase reversa y para la separación de histamina y tiramina se realizó la derivatización con o-phthaldialdehído (OPA), realizando la detección por fluorescencia

#### 6.1.-Estandarización de la técnica de HPLC.

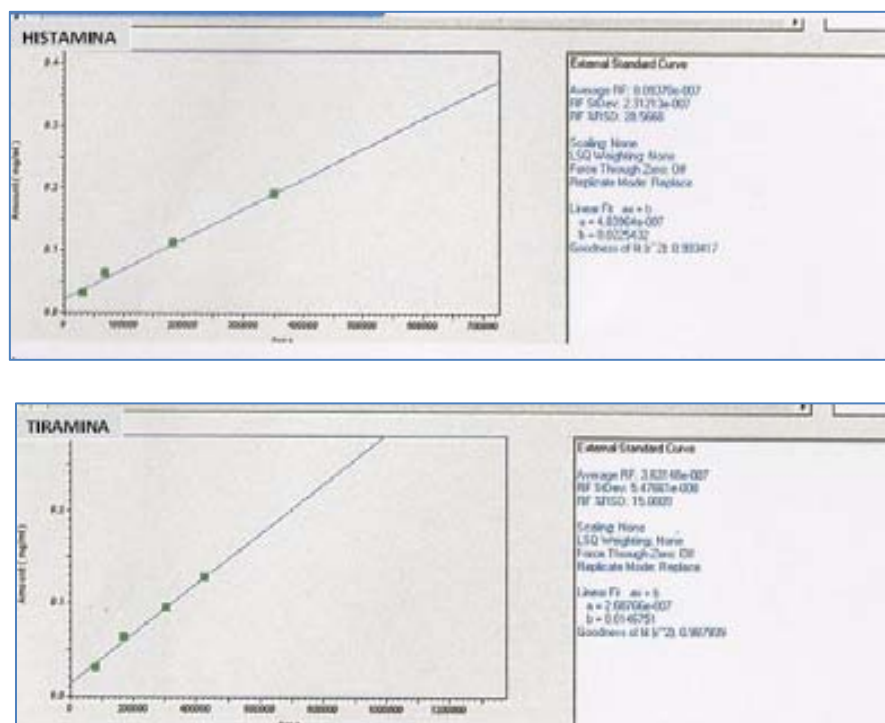
Con la metodología descrita previamente para la identificación y cuantificación de las aminas biógenas se encontró un tiempo de retención para la histamina de 15,78 min y de 30,68 min para la tiramina. El límite de detección obtenido para ambas aminas fue de 25 mg/L.

En la figura 7 se muestra el cromatograma de los estándares en diferentes concentraciones donde se observan los tiempos de retención.



**Figura 7.** Cromatograma de histamina y tiramina a diferentes concentraciones del estándar

En la figura 8 se presenta los datos de calibración para histamina y tiramina en el HPLC y se muestra la linealidad con las diferentes concentraciones de los estándares, así como el coeficiente de correlación de 0,993 para histamina y de 0,987 para tiramina.



**Figura 8.** Curvas de calibración para la determinación de histamina y tiramin

## 6.2 Resultados y discusión

### 6.2.1. Determinación de aminas biógenas en tres momentos de la vida de anaquel

Los resultados de la cuantificación de histamina y tiramina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) realizados en tres momentos de la vida de anaquel de los quesos se muestran en la tabla 16, se reporta el promedio y las desviaciones estándar del contenido de histamina y tiramina en mg/Kg. En la primera semana de su adquisición, se detectó tiramina en el 37,5% de los quesos (B, C y F), en concentraciones de 34 y 122 mg/Kg. No se encontró la presencia de histamina en ningún queso.

**Tabla 16.** Cuantificación de histamina y tiramina en diferentes momentos de almacenamiento.

QUESOS	INICIO		VIDA MEDIA		FINAL	
	HISTAMINA mg/Kg	TIRAMINA mg/Kg	HISTAMINA mg/Kg	TIRAMINA mg/Kg	HISTAMINA mg/Kg	TIRAMINA mg/Kg
A	ND	ND	45 ±4	59 ±15	192 ±20	115 ±10
B	ND	122 ±12	ND	160 ±18	ND	209 ±2
C	ND	34 ±2	ND	160 ±17	ND	166 ±6
D	ND	ND	ND	147 ±4	64 ±11	194 ±24
E	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	42 ±8	ND	139 ±9	ND	150 ±1
G	ND	ND	ND	ND	46 ±6	205 ±4
H	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND=No detectado

Limite de detección= 25mg/L

A la mitad de la vida de anaquel se detectó tiramina en 5 quesos, una mayor concentración se encontró en los quesos B y C 160 mg/Kg; en esta etapa, en el queso A se detectaron histamina y tiramina con 45 mg/Kg y 59 mg/Kg respectivamente. De esta forma a la mitad de la vida de anaquel uno de 8 quesos (12,5%) presentaban histamina y 5 de 8 presentaban tiramina (62,5%).

Al término de la vida de anaquel (aprox. 4 meses) se detectó histamina en los quesos A, D y G, (37,5% de los quesos analizados); se puede apreciar que en una muestra de queso (A) la concentración aumentó más de 4 veces su concentración (de 45 a 192 mg/Kg). La tiramina se detectó en un 75% de los quesos en concentraciones de 115 mg/Kg a 209 mg/Kg. La concentración de tiramina aumentó en las muestras B, C, D, F, G. con el paso del tiempo. Es importante destacar que los quesos E y H no presentaron histamina ni tiramina en los diferentes momentos de almacenamiento analizados.

En las gráficas de la fig. 9 se presenta la evolución del el incremento de la concentración de aminas biógenas en los quesos en los diferentes momentos de la vida de anaquel. En el inciso a) se muestra lo encontrado al inicio de la vida de anaquel, donde se observa la presencia de tiramina en tres muestras de queso. En esta etapa no se detectó histamina en ninguna muestra.



**Figura 9.** Cuantificación de histamina y tiramina en los quesos por HPLC: a) inicio de la vida de anaquel; b) a la mitad de la vida de anaquel y c) al final de la vida de anaquel.

En el inciso b) se observa la concentración de histamina y tiramina en los quesos a la mitad de su vida de anaquel donde un queso presentó histamina y tiramina en 5 muestras. En el inciso c) corresponde a la fecha de caducidad de los quesos se observa que tres muestras presentaron histamina y tiramina, tres solo tiramina y 2 fueron negativos para ambas aminas. Al comparar los incisos b y c se puede apreciar el incremento de la concentración de tiramina, alcanzando en algunos quesos los 200 mg/Kg.

Los resultados obtenidos de histamina en el queso A al final de su vida de anaquel en las muestras de queso son similares a las reportada por Contreras y col, (2007) e Izquierdo y col, (2003), en esos venezolanos brie y parmesano respectivamente y superiores a los encontrados por Contreras y col, (2007) en los quesos manchego y parmesano.

Vallejos y col, (2012) reportaron en quesos cheddar adquiridos en diferentes supermercados en Filipinas concentraciones de histamina similares (218 mg/Kg) a las encontradas en la muestra B.

Sumner y col , (1985) señalan que el hallazgo de histamina en los quesos madurados podría deberse a la disponibilidad de histidina libre presente debido a la proteólisis que ocurre durante el proceso de maduración.

En la actualidad la normatividad en México, sobre la concentración máxima de histamina solo existe para pescado fresco y procesado. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-242-SSA1-2009) marca como límite de histamina 100 mg/Kg, cifras similares a las establecidas por la Unión Europea para alimentos fermentados, de acuerdo con estas normas, solo una muestra de queso no cumple con lo estipula la norma.

Por otra parte la Administración de Alimentos y Medicamentos estadounidense (USFDA) fija como límite máximo 50mg/Kg para histamina y considera como riesgo concentraciones entre 50-200 mg/Kg lo que indicaría que el final de la vida de anaquel el 37% de los quesos chihuahua pueden ser riesgo para la salud ya que se detectó en tres quesos concentraciones superiores a 50 mg/Kg.

Con respecto a la tiramina en este estudio encontramos que al inicio de su vida de anaquel tres quesos presentaban concentraciones medias desde  $34 \pm 2$  a  $122 \pm 12$ mg/Kg.

Las muestras de quesos B y G al final de su vida de anaquel fueron los que presentaron mayor concentración de tiramina,  $209$  y  $205 \pm 4$  respectivamente. Concentraciones similares fueron reportadas por Standarová *et al.*, (2009) en queso Olomouc curd ( $190 \pm 90,3$ mg/Kg) con 7 semanas de maduración e inferiores a las reportadas por Adel y Abdel-Moamen (2010) en quesos gouda.

En relación a la normatividad de la concentración de tiramina, el Codex Nutricional de la República Eslovaca (Karavicova y Kohajdova, 2005) marca como límite 200mg/Kg. Siendo la única organización que aborde los límites permitidos para tiramina en alimentos. En este estudio los quesos B y G presentaron concentraciones superiores a 200mg/Kg de tiramina lo que representa un riesgo para personas con inhibición de la enzima monoamino oxidasa.

Los resultados de histamina y tiramina variaron a pesar de tratarse de un mismo tipo de queso, esto debido que fueron elaborados por diferentes empresas, pudiendo influir el utilizar

diferentes cultivos iniciadores y el proceso de manufactura de los mismos como lo ha señalado Burdychova y Komprda, (2007) y Novella col, (2004).

En México no se ha estandarizado el proceso de elaboración de este tipo de queso como lo que ha propuesto una nueva Norma NMX-F-738 COFOCALEC 2011, específica para la elaboración del queso chihuahua (Anónimo, 2011).

Analizando en conjunto los datos presentados previamente se puede decir que, el efecto de la marca de queso sobre la concentración de aminas biógenas no es determinante, pero si influyen significativamente las cepas utilizadas como cultivos iniciadores y la calidad de la materia prima utilizada en su elaboración como lo han expresado previamente Contreras y col, (2007).

Ordóñez y col, (1997) encontraron que los niveles de tiramina en queso de leche de oveja aumento en un tiempo de maduración de 180 días. El contenido de tiramina inició con una concentración de 27,4mg/Kg y alcanzó los 238 mg/Kg en 180 días. Estudios similares en leche de oveja realizaron Signore y Di Giacomo en 2008 demostrando que la formación de amina aumentó en relación al tiempo de maduración y que al incrementar la temperatura mayor fue la concentración de tiramina e histamina.

Estudios realizados por Díaz-Cinco y col, (1992) realizaron un estudio de la presencia de histamina y tiramina en quesos chihuahua adquiridos en el estado de Chihuahua directamente de las empresas que los elaboran, las muestras fueron almacenadas a 5° y 25°C durante un periodo de 12 días, reportando que las concentraciones de histamina y tiramina incrementaron al aumentar la temperatura y el tiempo de almacenaje, donde concluye que estos factores contribuyen a la producción de histamina y tiramina. Cabe señalar que las muestras de nuestro estudio en queso chihuahua estuvieron siempre a 1°C.

La tiramina es la amina biógena de mayor concentración reportada en quesos por diferentes investigadores como en el caso de los quesos cheddar, gouda y ras (Adel y Abdel-Moamen, 2010) en queso herby (Andiç *et al.*, 2010), en queso típico italiano (Innocente y D'Agostín, 2002), en queso Cseh blue-vein (Komprada *et al.*, 2008) y en queso italian pecorino (Schirone *et al.*, 2012).

La tiramina, es de especial interés debido al efecto vasoactivo que produce sobre consumidores susceptibles, (con inhibición de la MAO) donde en estos individuos, la ingesta

de 6 mg de tiramina tiene efectos leves y de 10 a 25 mg aumenta el riesgo de hipertensión cuando se ingiere en combinación con inhibidores de la MAO (McCabe-Sellers, 1986).

En esta investigación en quesos chihuahua encontramos que al inicio de su vida de anaquel tres quesos presentaban tiramina con variaciones desde  $34\pm 2$  hasta  $122\pm 12$  mg/Kg. y al final de su vida de anaquel seis muestras presentaron concentración que de 115 mg/Kg a  $209\pm 2$  mg/Kg.

Se conoce que se requieren varias condiciones para que se formen las aminas biógenas en quesos, entre las principales esta la presencia de microorganismos con enzimas amino descarboxilasa las cuales incrementan su actividad máxima a pH de 5,0 (Marcobal *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2007). Por otra parte se requiere la presencia de proteína hidrolizada que proporciona el sustrato (aminoácidos libres), de carbohidratos fermentables (glucosa como fuente de energía) y del fosfato de piridoxal (actúa como coenzima), además le son propicias una baja concentración de sal y altas temperaturas de almacenaje (Aliakbarlu *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2007; Pinho *et al.*, 2004; Maijala, 1993).

A todos los anteriores factores se suma el tiempo de maduración donde aumentan los microorganismo propios de este proceso, los cuales son responsables de que aumente la proteólisis (Aliakbarlu *et al.*, 2009).

### **6.3.- Conclusión**

No todos los quesos chihuahua presentan aminas biógenas durante su almacenamiento.

Existe diferencia en el contenido de histamina y tiramina en las diferentes marcas de quesos chihuahua.

La concentración de histamina y tiramina en las muestras que resultaron positivas para estas aminas se incrementó durante la vida de anaquel, debido a que durante la maduración y el almacenamiento se generan las condiciones idóneas para la descarboxilación como la activación de la enzima amino descarboxilasa de las bacterias en condiciones de acidificación, se incrementa la concentración de nitrógeno amoniacal.

Las cifras presentadas de tirosina no presentan riesgo para los consumidores, no así el contenido de histamina al final de la vida de anaquel, de acuerdo a la normatividad de la FDA.

#### 6.4. Bibliografía

1. Adel E y Abdel-Moamen A. (2010). Comparison of biogenic amines levels indifferent processed cheese varieties with regulatory specifications. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 5 (2): 127 – 133.
2. Aliakbarlu J; Alizadeh M; Razavi-Rohani S; Vahabzade Z; Saei S; Agh N. (2009). Effects of processing factors on biogenic amines production in Iranian white brine cheese. *Research Journal of Biological Sciences* 4 (1): 23 –28.
3. Andic S Gencelep H; Kose S. (2010). Determination of Biogenic Amines in Herby Cheese. *International Journal of Food Properties*. Vol 13, p 1300-1314.
4. Anónimo (2009). NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.
5. Anónimo (2011). NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema producto leche-alimentos-lácteos-alimento lácteo regional-queso cotija artesanal madurado-denominacion, especificaciones y métodos de prueba.
6. AOAC (1997). Association of Official Analytical Chemists Histamine in seafood: Biological method. Sec. 35.1.30, Method 954.04. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed., P.A. Cunniff (Ed.), p.14-15.
7. Aygün O; Schneider E; Scheuer R; Usleber E; Gareis M; Märtlbauer E. (1999). Comparison of ELISA and HPLC for the determination of histamine in cheese. *J Agric Food Chem*; 47(5):1961-1966.
8. Burdychova R; Komprda T. (2007) Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol*; 276(2):149-55.
9. Chang SF; Ayres JW; Sandine WE. (1985). Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophane. *Journal Dairy Sci.* (11):2840-6.
10. Contreras M; Izquierdo P; Allara M; García A; Torres G Y; Céspedes E. (2007). Determinación de aminas biógenas en quesos madurados. *Revista científica Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad del Zulia* 17 (1):89-95.



11. Díaz-Cinco M.E; Fraijo O; Grajeda P; Lozano-Taylor X; González de Mejía E. (1992). Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationship to histamine and tyramine, *J. Food Sci.*, 57, 355.
12. Eerola S; Hinkkanen R; Lindfors E; Hirvi T. (1993). Liquid Chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages *Journal of AOAC International* 76-3: 575-577.
13. Fernández M; Flores AB; Linares DM; Mayo B and Alvarez M. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*. 74 276–282.
14. Innocente N y D'Agostin P. (2002). Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. *Journal Food Prot*; 65(9):1498-501
15. Izquierdo P; Allara M; Torres G; García A. (2003) Queso madurado manchego, parmesano y de año. *Revista científica FCV*. Vol. XIII No 6 p431-435
16. Karovicova J; Kohajdova Z. (2005). Biogenic Amines in Food. *Chem*. pp.59-1: 70-79.
17. Komprda T; Dohnal V; Závodníková R. (2008). Contents of Some Biologically Active Amines in a Czech Blue-vein Cheese. *Czech J. Food Sci*. Vol. 26, No. 6: 428–440
18. Kutlan D; Presits P; Molnar-Perl I. (2002). Behavior and characteristics of amines derivatives obtained with ophthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and with o-phthaldialdehyde/N-acetyl-l-cysteine reagents. *Journal of Chromatography. A* 949: 235–248.
19. Maijala R L. (1993). Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology* 17, 40–43.
20. McCabe B.J; (1986). Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens: a review. *Journal of the American Dietetic Association* 86, 1059–1064.
21. Marcobal A; De la Rivas B; Muñoz R. (2006). Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey. *Journal of Consumer Protection and Food Safe*. P 187-196.
22. Nilgun H; Budak F; Karahan A; Cakmakc L. (2008). Factors affecting histamine and tyramine formation in Turkish White Cheese. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. 36 (3), 197-206.

23. Novella-Rodriguez S; Veciana-Noges MT; X Roig-Sagues A; Trujillo-Mesa AJ; Vidal-Corou C. (2004). Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat from pasteurized and raw milk. *Journal of dairy research*. Vol. 71-02 p245-252.
24. Ordoñez A; Ibañez F; Torre P; Barcina Y. (1997). Formation of biogenic amines in Adiazábal ewe's milk cheese: effect of ripening, pasteurization, and starter. *Journal of Food Protection* 60 (11): 137 –1375.
25. Peng J; Fang K; Xie D; Ding B; Yin J; Cui X; Zang Y; Liu J. (2008). Development of an automated on-line pre-column derivatization procedure for sensitive determination of histamine in food with high-performance liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1209 70–75.
26. Pinho O; Pintado A; Gomes A; Pintado M; Malcata F; Ferreira I. (2004). Interrelationships among microbiological, physicochemical, and biochemical properties of Terrincho cheese, with emphasis on biogenic amines. *Journal of Food Protection* 67 (12): 2779-2785.
27. Rohani RS; Aliakbarlu J; Ehsani A; Hassanzadazar H. (2013). Biogenic amines determination in some traditional cheeses in West Azerbaijan province of Iran. *Veterinary Research Forum*. 4 (2) 115 – 1183.
28. Schirone M; Tofalo R; Fasoli G; Perpetuini G; Corsetti A; Manetta AC; Ciarrocchi A, Suzzi G. (2012). Biogenic Amines in Italian Pecorino Cheese. *Frontiers microbiology* Vol 3.Art 171. P1-9.
29. Signore A; Di Giacomo. (2008). Technological factor influencing the biogenic amine content in sheep cheeses and sensorial analysis (time of ripening, temperature, Form size, anti-mould). *Journal Commodity Sci. Technology Quality*, 47 (i-iv), 229-243.
30. Smela D; Pechova P; Komprda T; Klejdus B; Vlastimil K. (2003). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat product during fermentation and long –term storage. *Czech J. Food Sci* 21-5:167-175.
31. Standarová E; Varlová L; Kordiovská P; Janstová B; Dracková M. (2010). Biogenic Amines production in Olomoc Curd cheese at various strong conditions. *Acta Vet Brno* 79:147-156.

32. Sumner S; Speckhard M; Somers E; Taylor S. (1985) Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. *Applied Environm. Microbiol.* 50 (4):1094-1096.
33. USFDA (US Food and Drug Administration). (2001). Scombrototoxin (histamine) formation. In: *Fish and fishery products hazards and controls guide*. Washington, DC: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office. pp. 73–93).
34. Vallejos MJ; Pham LJ; Barraquio V L. (2012). Biogenic Amines in Some Natural and Processed Cheeses Sold in Laguna Province, Philippines. *Philippine Journal of Science.* 141 (1): 111-115.
35. Yildirm H. K; Uren A; Yucel U. (2007). Evaluation of Biogenic Amines in Organic and Non-Organic Wines by HPLC OPA Derivatization. *Food Technolgy. Biotechnolgy.* 45-1:62-68.

## CAPITULO VII

### IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICA PARA LAS ENZIMAS *HDC* Y *TDC* EN QUESOS

#### 7. Introducción

Para identificar cepas bacterianas productoras de aminas biógenas en alimentos se utilizan métodos moleculares donde se investiga la presencia de los genes que codifican para las enzimas amino descarboxilasas. Existen métodos muy sensibles como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), procedimiento basado en la amplificación de los ácidos nucleicos del genoma bacteriano (ADN). Estos métodos tienen una menor variabilidad y son más específicos que los basados en el perfil bioquímico.

Las enzimas descarboxilasas producen aminas biogenas como histamina y tiramina, las cuales tienen efectos tóxicos sobre diferentes sistemas del organismo humano.

Para la identificación de los genes que codifican para la enzimas histidina y tirosina descarboxilasa (*HDC* y *TDC*) en quesos generalmente se realiza la extracción de ADN de las diferentes cepas bacterianas previamente aisladas en medios de cultivo específicos de las muestras (Kalhotka *et al.*, 2012; Bhardwaj *et al.*, 2009; Burdychov *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2006; De las Rivas *et al.*, 2006; Le June *et al.*, 1995), solo algunas publicaciones reportan extracción de ADN directo de la matriz del queso para identificar genes *hdc* y *tdc* (Ladero *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2006, 2007). El aislamiento y cultivo de las cepas representa un paso adicional y la limitante de solo analizar los microorganismos cultivables que no siempre corresponde a la microbiota total de estos quesos fermentados.

Diferentes investigadores han diseñados oligonucleótidos que permiten detectar la presencia del gen *hdc* (Fernández *et al.*, 2006; Constantini *et al.*, 2006; De las Rivas *et al.*, 2006; Landeta *et al.*, 2005; Le Jeune *et al.*, 1995) para el presente estudio fueron seleccionados los oligonucleótidos reportados por Fernández *et al.*, (2006) los cuales se probaron con resultados positivos.

De la misma manera se han diseñado oligonucleótidos específicos para la detección del gen *tdc* por diferentes investigadores. Lucas y Lonvaud, (2002) diseñaron oligonucleótidos para la detección del gen *tdc* de *Lactobacillus brevis*.

En este estudio se hizo la detección de los genes histidina de carboxilasa (*hdc*) y tirosina descarboxilasa (*tdc*), que codifican para las enzimas HDC y TDC utilizando oligonucleótidos específicos para los genes mencionados.

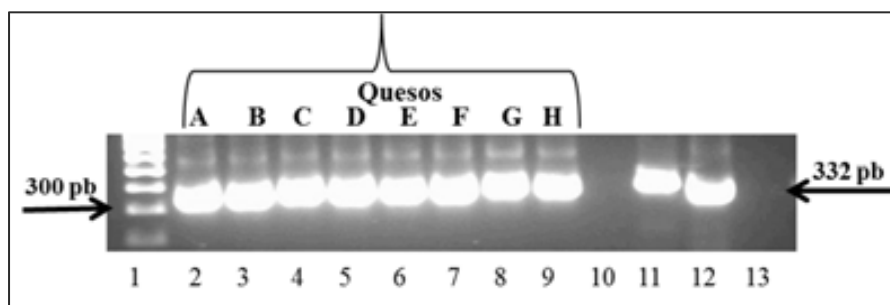
## 7.1. Resultados y discusión

### 7.1.1. Identificación de ADN ribosomal (ADNr) bacteriano extraído directamente de quesos.

En taxonomía bacteriana moderna, el análisis de las secuencias de la subunidad 16S del ADNr bacteriano es considerado como una herramienta de gran alcance global para investigar relaciones filogenéticas. El estudio de este fragmento ha sido ampliamente utilizado en la clasificación de bacterias que forman parte de la microbiota de diferentes alimentos. En este estudio se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Ventura *et al.*, (2001) dirigidos a regiones conservadoras de los ADNr que apoyan la clasificación de eubacterias.

Después de realizar la extracción de ADN directamente de las muestras de queso, fue necesario comprobar que este correspondía a ADN proveniente de las bacterias presentes en el queso

En la figura 10 se muestra la electroforesis de los productos de PCR donde se identificó, en todas las muestras de quesos, la banda de 332 pb correspondiente al fragmento del ADNr 16S bacteriano, comprobando así la presencia de ADN de origen procariota.

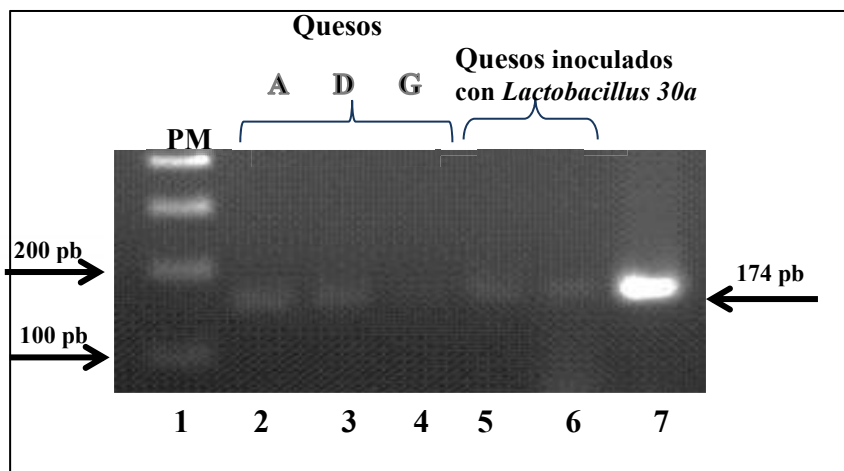


**Figuras 10.** Productos de PCR del fragmento del 16S ADNr bacteriano. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1) Marcador de peso molecular, carriles 2- 9) ADN obtenidos de muestras de quesos, 10) vacío, carril 11) *Lactobacillus 30a*, carril 12) *Lactobacillus brevis*, 13) Control (-).

### 7.1.2 Presencia del gen histidina descarboxilasa

La figura 11 se muestran los resultados de las muestras de quesos analizadas por PCR para la detección del gen histidina descarboxilasa (*hdc*), donde se observa el fragmento de 174 pb, las muestras de ADN corresponden a los quesos identificados como A, D y G así como en la cepa

control positivo *Lactobacillus 30a*. También se logró amplificar el gen *hdc* de una muestra de queso que fue inoculado con la cepa pura de *Lactobacillus 30a* en una concentración de  $10^6$  y  $10^7$  UFC/g.



**Figura 11.** Identificación por PCR del gen histidina des carboxilasa (*hdc*). Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril. 1) Marcador molecular de peso molecular, carriles 2 -4) muestras de queso, carriles 5 y 6) quesos inoculados con *L.30a*, carril 7) Control (+).

Investigaciones realizadas por Le Jeune y col, (1995) compararon la secuencia de nucleótidos del gen *hdc* de la cepa de *Lactobacillus sp.30a* utilizados por Vanderslice y col en 1986 y secuencia de nucleótidos del *Lactobacillus buchneri* reportados por Huynh y Snell en 1985, estos estudios de alineamientos mostraron la existencia de un alto grado de similitud entre los genes *hdc* en las diferentes bacterias.

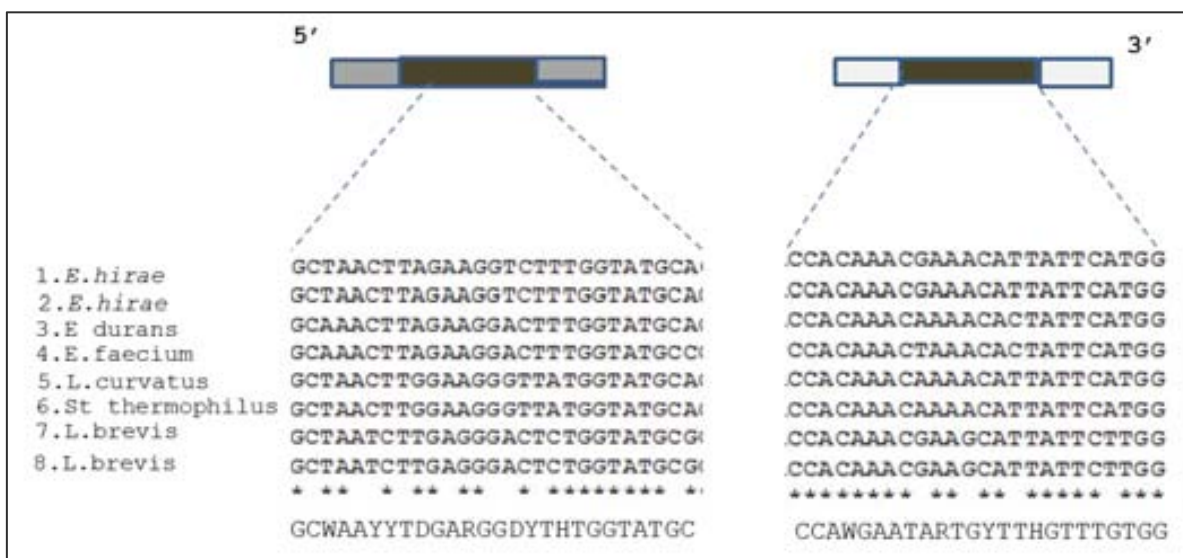
Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados por Fernández y col., (2006b) para detectar el gen histidina descarboxilasa en bacterias BAL en leche sin pasteurizar por PCR tiempo real (rtPCR). En su estudio ellos encontraron que con estos oligonucleótidos era posible la detección del gen *hdc* de diferentes bacterias Gram positivas como *Lactobacillus buchneri* B201 (CAG 44438); *Oenococcus oeni* 9204 (AAC38298); *Lactobacillus sp 30a* (ATCC33222); *L. higar dii* 0006 (AAV65956.1) *C. perfinges* (ATCC 13124); *T. murtaticus* (BAD51812) y *Micrococcus sp* (PN0143), en las muestras analizadas en este estudio se encontró únicamente la presencia del gen *hdc* en 3 de 8 diferentes marcas de producto.

Aunque por métodos microbiológicos en los quesos A, D y G se determinó la presencia de *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *L. lactis sub lactis* y *L. rhamnosus*, no podemos asegurar que el ADN proviene únicamente de esos microorganismos ya que pudiese haber otras especies

de bacterias cuya identificación no es posible por métodos microbiológicos. Para de terminar esto sería conveniente realizar la secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR.

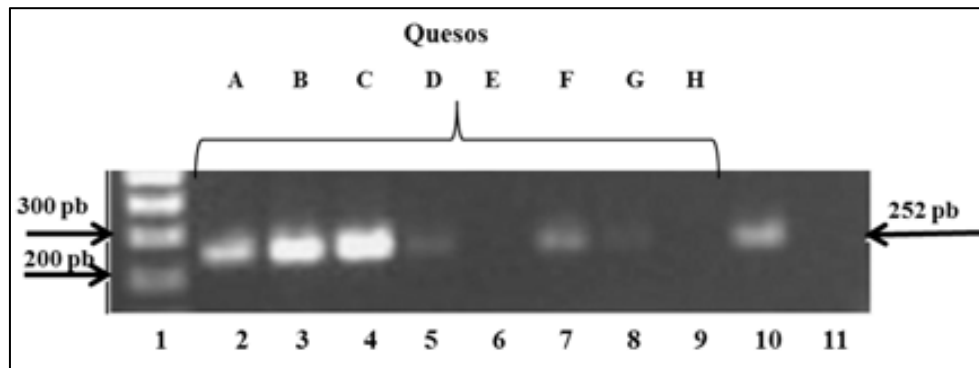
### 7.1.3. Presencia del gen *tiramina descarboxilasa*

Para la identificación del gen *tdc* por PCR se diseñó un par de oligonucleótidos degenerados. Se realizó la comparación de las secuencias nucleotídicas del gen *tdc*, procedentes de distintas cepas bacterianas y se identificaron los dominios conservados; en la figura 12 se presenta la secuencia de nucleótidos de las 8 cepas analizadas, así como los dominios que se eligieron para el diseño de los oligonucleótidos degenerados, las secuencias resultantes son GCWAAYYTDGARGGDYHTGGTATGC y CCAWGAATARTGYTTHGTTTGTGG para los oligonucleótidos directo y reverso, respectivamente, considerando la secuencia del gen *hdc* de la cepa ATCC361 de *L. brevis*, se estimó el tamaño esperado del fragmento amplificado por PCR en 252 pb.



**Figura 12** . Regiones conservadas seleccionadas para el diseño de oligonucleótidos degenerados para identificar el gen *tdc*.

En la figura 13 se observan los resultados obtenidos por PCR para identificar el gen tirosina descarboxilasa (*tdc*) con los oligonucleótidos degenerados. Se detectó el fragmento del gen blanco en el 75% de quesos (A, B, C, D, F, G) identificando la banda esperada de 252 pb del gen *tdc*.



**Figura 13.** Productos de PCR con los oligonucleótidos degenerados para identificar el gen tirosina descarboxilasa (*tdc*). Electroforesis en gel de agarosa al 3%. Carril 1) Marcador molecular, carriles 2-9) muestras de quesos, carril 10) control (+) (cepa pura de *L. brevis*), carril 11) control (-).

#### 7.1.4. Identificación de los genes histidina descarboxilasa y tirosina descarboxilasa en muestras de queso.

A partir de ADN aislado en forma directa de las diferentes marcas de queso chihuahua se encontró que en 6 de los 8 quesos analizados (75%) se detectó el gen tirosina descarboxilasa (*tdc*), mientras que solo en 3 quesos (37,5%) se logró detectar el gen *hdc*.

En la tabla 17 presenta los resultados del análisis molecular de la presencia de los genes *hdc* y *tdc*

**Tabla 17.** Presencia de los genes *hdc*, *tdc* en las muestras de quesos

Queso	Detección molecular de genes aminoácido descarboxilasa	
	<i>Hdc</i>	<i>Tdc</i>
A	(+)	(+)
B	(-)	(+)
C	(-)	(+)
D	(+)	(+)
E	(-)	(-)
F	(-)	(+)
G	(+)	(+)
H	(-)	(-)

(+) = presencia de gen

(-) = Ausencia del gen



Al analizar los resultados de la PCR de los quesos chihuahua (Tabla 17) se identificó la presencia del gen *hdc* en tres marcas (A, D, G), mientras que el gen *tdc* se detectó en seis productos (A, B, C, D, F y G), es importante destacar que en dos quesos (E y H) los resultados fueron negativos para ambos genes. Estos resultados se comprobaron por PCR en 15 análisis de muestras de diferentes lotes).

Al igual que en los quesos analizados en este trabajo, la presencia del tiramina ha sido señalada como la más frecuente de las aminas biógenas. Estudios realizados por Roig-Sagués y col, (2002) en 44 quesos tradicionales españoles reportan la presencia de microorganismos con enzimas productoras de histamina y tiramina. Encontraron que la tiramina es producida por bacterias gram positivas, principalmente BAL y enterococos, mientras que la histamina fue producida por bacterias gram negativas, detectando la presencia de tiramina en todos los quesos analizados, en cantidades muy variables (10 hasta 1807 mg/Kg de queso), la histamina reportada se encontraba en concentraciones menores (3,9 a 928 mg/Kg) y no estaba presente en todos los quesos.

Más tarde, investigaciones realizadas por Bonetta y col, (2008) para detectar aminas biógenas en queso de cabra italiano (Rabiola di Roccaverano) con una maduración de 20 días (similar al queso chihuahua) por cromatografía reportaron que la tiramina fue la amina más abundante, seguida de la histamina.

Standarova y col, (2009) un estudio realizado en el queso Niva (queso de vena azul) donde investigaron la presencia de ocho aminas biógenas por métodos microbiológicos y de cromatografía identificando que la tiramina fue la amina más abundante junto con la cadaverina. En este estudio el 97% de las cepas aisladas de *Enterococcus* presentaron capacidad de producir tiramina así como un 22,7% de las cepas de *Lactobacillus*.

#### **7.1.5. Comparación de las diferentes técnicas para evaluar aminas biógenas.**

En las tablas 18 y 19 se presentan los resultados obtenidos en quesos chihuahua, obtenidos por diferentes técnicas en forma cualitativa las pruebas microbiológicas en cuatro diferentes tiempos de almacenamiento las concentraciones obtenidas por cromatografía (HPLC) en tres tiempos de almacenamiento y la identificación de los genes *hdc* y *tdc* por PCR.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos por las diferentes técnicas mostró una correlación significativa ( $p=0.024$ ) entre la presencia del gen y la cuantificación de histamina al final de la vida de anaquel realizada por (HPLC), pero no se encontró correlación con las concentraciones al inicio de la vida de anaquel, (donde no hay detección de histamina) ni a la mitad de la vida de anaquel donde solo una muestra presenta esta amina biógena. Tampoco se observó correlación entre la presencia del gen con la formación de histamina en el medio de cultivo específico, en el que los resultados obtenidos con la muestra D, fuerin negativos en todos los tiempos analizados (Tabla 18).

**Tabla 18.** Resultados de la detección de histamina en quesos por 3 técnicas diferentes de análisis

Queso	HISTAMINA							
	Medio de cultivo específico para enzima HDC				(HPLC) Histamina mg/Kg			Presencia de gen <i>htc</i>
	Tiempos de almacenamiento				Tiempos de almacenamiento			
	1	2	3	4	1	2	3	
A	(-)	(-)	(+)	(+)	ND	45 ±4	192 ±20	(+)
B	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	ND	(-)
C	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	ND	(-)
D	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	64 ±11	(+)
E	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	ND	(-)
F	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	ND	(-)
G	(-)	(+)	(+)	(+)	ND	ND	46 ±6	(+)
H	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	ND	(-)

El análisis de los datos de la presencia del gen *tdc* con los resultados de HPLC se observa una correlación altamente significativa ( $p=0.001$ ) al final de la vida de anaquel. No se encontró correlación al inicio ni a la mitad del tiempo de almacenamiento. También se encontró correlación altamente significativa ( $p=0.001$ ) entre la presencia del gen y la detección microbiológica al final de la vida de anaquel, no así en todos los demás momentos evaluados (Tabla 19).

**Tabla 19.** Resultados de la detección de tiramina en quesos por 3 técnicas diferentes de análisis

Queso	TIRAMINA							Presencia de gen <i>tdc</i>
	Medio de cultivo específico para enzima TDC				(HPLC) Tiramina mg/Kg			
	Tiempos de almacenamiento				Tiempos de almacenamiento			
	1	2	3	4	1	2	3	
A	(-)	(+)	(+)	(+)	ND	59 ±15	115 ±10	(+)
B	(+)	(+)	(+)	(+)	122 ±12	160 ±18	209 ±2	(+)
C	(-)	(+)	(+)	(+)	34 ±2	160 ±17	166 ±6	(+)
D	(-)	(-)	(-)	(+)	ND	147 ±4	194 ±24	(+)
E	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	ND	(-)
F	(-)	(+)	(+)	(+)	42 ±8	139 ±9	150 ±1	(+)
G	(-)	(-)	(+)	(+)	ND	ND	205 ±4	(+)
H	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	ND	(-)

Coton col, (2004) demostraron que la formación de tiramina no es exclusiva de una especie que tiene relación con cepas diversas que poseen el gen que codifica la enzima específica de tirosina descarboxilasa.

Bhrdwaj col, (2009) realizaron estudios para probar la capacidad de las cepas de *Enterococcus sp* de formar tiramina, utilizando cultivos puros, reportando una correlación del 100% entre los resultados observados en un medio específico para detectar bacterias con enzima TDC, la identificación por PCR del gen *tdc* y la determinación de tiramina por HPLC.

Fernández col, (2007) utilizando en 61 muestras de quesos elaborados con diferentes tipos de leche y diferentes tratamientos (pasteurizada y sin pasterizar), cuantificaron por HPLC la tiramina presente en los quesos y por la PCR, realizaron la identificación del gen *tdc* reportando una correlación entre los 2 métodos.

En esta investigación se utilizaron muestras de queso de leche pasteurizada, por lo que no se detectaron bacterias patógenas, ni enterobacteriáceas, es posible que la pasteurización de la leche disminuya el contenido de bacterias totales y por lo tanto pudiera reducir también la producción de aminas biógenas en los quesos. La pasteurización disminuye las bacterias con enzimas amino descarboxilasas como las enterobacteriáceas y enterococos (Novella-Rodríguez *et al.*, 2004; Marino *et al.*, 2000; Ordoñez *et al.*, 1997).

Joosten y Northolt en 1987 atribuyen la disminución de histamina y tiramina entre productos pasteurizados y no pasteurizado, no solo a la disminución de bacterias con enzima amino descarboxilasa sino además a la destrucción por efecto del calor del cofactor pirofosfato de piridoxal el cual es indispensable para la función de estas enzimas.

Al realizar la extracción directa del ADN bacteriano de las muestras de queso para detectar bacterias con los genes *hdc* y *tdc*, es posible incluir microorganismos que no sean factibles de cultivar lo que daría resultados falsos negativos si se realizaran los aislamientos de los microorganismos del queso. Por otra parte, se obtuvo una buena correlación de la PCR y la determinación de la concentración de histamina y tiramina al final de la vida de anaquel. Lo que esta técnica representa una buena opción que permite predecir desde el momento de la producción, si los quesos elaborados desarrollaran las aminas biógenas al final de la vida de anaquel.

## 7.2. CONCLUSIONES

Para extracción directa de ADN bacteriano de las muestras de quesos chihuahua se hizo una adaptación que permitió utilizar en quesos con alto contenido de grasa ya que presentan una dificultad.

En las muestras de ADN obtenidas fue posible la identificación de los genes *hdc* y *tdc*, que codifican para las enzimas responsables de la biosíntesis de aminas biógenas: histamina y tiramina.

Los oligonucleótidos degenerados diseñados permitieron la detección del gen *tdc*, tanto en el ADN bacteriano obtenido de las muestras de queso como el obtenido de los cultivos bacterianos puros (controles).

La presencia de genes *hdc* y *tdc* determinados por PCR, mostró una alta correlación con la presencia de las aminas histamina y tiramina en las muestras de queso, analizadas por cromatografía (HPLC).

Los métodos moleculares empleados mostraron ser una metodología que en forma temprana da indicios confiables de que los quesos pueden formar aminas biógenas, aun antes de que éstas se desarrollen en el queso.

#### 7.4. BIBLIOGRAFÍA

1. Bhardwaj A; Gupta H; Iyer R; Kumar N; Malik RK. (2009). Tyramine-producing enterococci are equally detected on tyramine production medium, by quantification of tyramine by HPLC, or by tdc gene-targeted PCR. *Dairy SciTechnol* 89: 601-611.
2. BLASTN, Centro Nacional de Biotechnology Information, Bethesda, MD
3. Bonetta S; Bonetta S; Carraro E; Coisson J.D; Travaglia F; Arlorio M. (2008). Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese. *J. Food Prot.* 71, 205–209.
4. Burdychova R; Komprda T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol*; 276(2):149-55.
5. ClustalW (<http://align.genome.jp/>).
6. Cocolin L; Manzano M; Cantoni C; Comi G. (2000). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5113–5121.
7. Connil N; Le Breton Y; Dousset X; Auffray Y; Rincé A; Prevost H. (2002). Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3537-3544.
8. Costantini A; Cersosimo M, Del Prete V; Garcia-Moruno E. (2006). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *Journal Food Protein*; 69 (2):391-6.
9. Coton M; Coton E; Lucas P; Lonvaud A. (2004). Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiology* Vol. 21, p 125-130.
10. De las Rivas B; Marcobal A; Carrascosa A V; Muñoz R. (2006). PCR detection of food bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. *Journal Food Prot* 69:2509–2514.

11. Díaz-García M. (2012). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias productoras de histamina en queso. Compendio de Tesis de Maester Universitario en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo. España.
12. Fernández M; Flores AB; Linares DM; Mayo B and Álvarez M. (2007) HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*. 74 276–282.
13. Fernández M; Flores AB; Linares DM; Mayo B; Álvarez M. (2006). Early PCR detection of tyramine-producing bacteria during cheese production. *Journal of dairy Resarch* 73:318-321.
14. Fernández M; del Río B; Linares D M; Martín M C; Álvarez M A. (2006b). Real time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine producing bacteria: use in cheese production. *J. Dairy Sci.* 89, 3763–3769.
15. Fernández-García E; Tomillo J; Núñez M. (1999). Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *Int. Journal. Food Microbiology*. 52, 189–196.
16. Huynh QK; Snell EE. (1985). Pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase. Comparative seuencias of cysteinyl peptides of the enzymes from *Lactobacillus 30a*, *Lactobacillus buchneri*, and *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal .Biology. Chemisty*. 260, 2798-2803.
17. Joosten H M; Stadhouders J. (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. Decarboxylative properties of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J*. 41: 247-258.
18. Kalhotka L; Manga I; Prichystalová J; Hulová M; Vyletelová M; Sustová K. (2012). Decarboxylase activity test of the genus *Enterococcus* isolated from goat milk and cheese. *Acta vet. Brno*, 81: 145–151.
19. Ladero V; Fernández M; Álvarez MA. (2009). Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses. *International Dairy Journal* 19 p 759–762.
20. Landete J M; De las Rivas B; Marcobal A; Muñoz R. (2011). PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on wine. Review. *Ann Microbiol*. 61:159–166.

21. Landete-Iranzo JM. (2005). Estudio y caracterización molecular de la producción de aminas biogénicas por parte de bacterias lácticas de origen enológico. Universidad de Valencia. Fac. de CC. Biológicas. Valencia.
22. Le June C; Lonvaud-Funel A; Ten Brink H; Hofstra; Van der Vossen J.M.B. (1995) Development of detection. System for histidine decarboxylating lactic acid bacteria on DNA probes, PCR and activity test. *Journal of applied Bacteriology* 78, 316-326.
23. Lucas P; Lonvaud-Funel A. (2002). Purification and partial gene sequence of the tyrosine Decarboxylase Operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in Tyramine-Producing Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 229: 65-71.
24. Marino M; Maifreni M; Moret S; Rondini. (2000). The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology*, p169 y 173.
25. Novella-Rodriguez S; Veciana-Noges MT; X Roig-Sagues A; Trujillo-Mesa A J; Vidal-Corou C. (2004). Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat from pasteurized and raw milk. *Journal of dairy research*. Vol. 71-02 p245-252.
26. Ordoñez A; Ibañez F; Torre P; Barcina Y. (1997). Formation of biogenic amines in Adiazábal ewe's milk cheese: effect of ripening, pasteurization, and starter. *Journal of Food Protection* 60 (11): 1371 – 1375.
27. Roig-Sague's AX; Molina AP; Hernández-Herrero MM. (2002). Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*, 215: 96–100.
28. Standarová E; Borkovcová M; Dusková H; Pridalová M; Dracková M; Vorlová L. (2009). Effect of Some Factors on the Biogenic Amines and Polyamines Content in Blue-Veined Cheese Niva. *Czech J. Food Sci*. Vol. 27, Special Issue.
29. Vanderslice P; Copeland, WC; Robertus JD. (1986). Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a. *Journal .Biology Chemistry* 15; 261(32):15186-91.
30. Ventura M; Reniero R; Zink R. (2001). Specific identification and targeted characterization of *bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a

combined multiplex-PCR approach. Applied and environmental microbiology, p. 2760–2765.



## 8. CONSIDERACIONES FINALES

En el presente trabajo se analizaron 8 quesos Chihuahua, elaborados en diferentes ciudades del país y uno de ellos elaborado en el extranjero (por una empresa mexicana). De los productos analizados 6 eran quesos genuinos, mientras que dos de ellos son “Imitación o Tipo”, ya que en su etiqueta declaraban la presencia de grasa vegetal.

Los estudios para investigar la calidad microbiológica de las muestras de queso mostraron que no contenían bacterias patógenas y cumplían las especificaciones microbiológicas de la normatividad mexicana para estos productos lácteos, al analizar los resultados microbiológicos de cuenta total de bacterias, *Lactobacillus*, y bacterias coliformes no se encontró correlación entre estos microorganismos con la presencia de histamina y tiramina, lo que indica que la cantidad de estos microorganismos no tiene una influencia determinante.

La calidad bromatológica fue también evaluada, y se encontró que hay variaciones importantes en el contenido de algunos nutrientes como grasa y proteína, es especial los quesos de imitación con contenidos inferiores a los establecidos en la normatividad. Al analizar los resultados bromatológicos y fisicoquímicos de las muestras (proteína, grasa, pH, N amoniacal y sodio) no se encontró correlación con la presencia de histamina y tiramina.

Considerando los resultados obtenidos con el presente trabajo, se corrobora que los métodos moleculares (PCR) son más sensibles que los métodos microbiológicos o enzimáticos.

En nuestros resultados, fue posible la detección de los genes *hdc* y *tdc* responsables de la biosíntesis de la histamina y la tiramina desde etapas tempranas de la vida de anaquel de los quesos.

Es importante considerar que los métodos moleculares son más sensibles solo permiten predecir la presencia y/o ausencia del gen, y que la presencia de estos no necesariamente asegura la biosíntesis de las aminas, ya que existen otros factores condicionantes para su producción (pH, nutrientes, inhibidores). Sin embargo su presencia incrementa el riesgo de que durante la vida de anaquel se generen estos compuestos tóxicos en los productos lácteos.

Dada la sensibilidad de estos métodos moleculares es posible que pueda ser aplicado para la detección de riesgo de producción de aminas en diferentes etapas del proceso de elaboración del queso.

Aunque en este trabajo se encontró una correlación significativa entre la detección molecular del gen con la presencia de aminas detectadas por HPLC al final de la vida de anaquel, es necesario la cuantificación de estas para determinar el potencial riesgo a la salud.

A diferencia de los métodos de HPLC y PCR los métodos microbiológicos son más sencillos, pero tienen el inconveniente de una menor sensibilidad. En el presente trabajo en una de las muestras analizadas (queso D) no fue posible la detección de bacterias con capacidad de sintetizar histamina, sin embargo por HPLC esta amina fue detectada al final de la vida de anaquel del producto; Por PCR fue posible la detección del gen *hdc* desde etapas tempranas del almacén. Estos resultados son sugerentes de la presencia de microorganismos en quesos responsables de la producción de histamina, pero que posiblemente las condiciones empleadas no fueron las adecuadas para su cultivo.

Un dato importante es que en el 25% de los quesos analizados no se detectaron los genes *hdc* y *tdc* ni se encontraron aminas biógenas (histamina y tiramina) en su vida de anaquel. Es importante señalar que los quesos con resultados negativos a aminas biógenas son los quesos de imitación.

# ANEXOS

Indicador	NOM -121	NMX-F-209		Queso A	Queso B	Queso C	Queso D	Queso E	Queso F	Queso G	Queso H
		Min	Max								
Proteína		≥ 22		23,08	23,53	24,86	21,28	22,39	23,29	20,55	20,70
Humedad			45%	40,0%	41,0%	42,5%	41,5%	42,0%	39,0%	39,5%	39,5%
Grasa butírica		≥ 26	23,95	22,78	19,42	19,42	24,36	26,28	18,97	23	12,12
pH		5,0	6,5	5,18	5,34	5,40	5,40	5,13	5,84	5,58	5,47
Sólidos totales		55%	55%	60%	59%	57,5%	58,5%	58%	61%	60,5%	60,5%
Coliformes fecales		10,000 UFC/g		1.8 X 10 <sup>3</sup> UFC/g	1.2 X 10 <sup>3</sup> UFC/g	1.9 X 10 <sup>3</sup> UFC/g	2.1 X 10 <sup>3</sup> UFC/g	4.0 X 10 <sup>3</sup> UFC/g	2.2 X 10 <sup>3</sup> UFC/g	2.6 X 10 <sup>3</sup> UFC/g	2.0 X 10 <sup>3</sup> UFC/g
<i>E coli</i>	50 UFC/g	1000 UFC/g		9 UFC/g	1 UFC/g	5 UFC/g	8 UFC/g	66UFC/g	1 UFC/g	42UFC/g	26 UFC/g
<i>St. aures</i>	100 UFC/g	100 UFC/g		8 UFC/g	83 UFC/g	5 UFC/g	4 UFC/g	45 UFC/g	0 UFC/g	53 UFC/g	3 UFC/g
<i>Salmonella</i> en 25 g.	Ausente	Ausente		Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Listeria sp</i>	Negativo	Negativo		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hongos y Levaduras	100 500 UFC/g UFC/g			4 UFC/g	7 UFC/g	10 UFC/g	7 UFC/g	9 UFC/g	7 UFC/g	1 UFC/g	3 UFC/g
Enzimas	√										
Saborizantes	√										
Espesantes	√										
Conservador			√								
colorantes	√		√	√		√	√	√			
Antifúngico	√										

Enterococcus hirae  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Lactobacillus  
 Streptococcus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus

TGATGTTCTTAGCTAACTAGAGGCTCTTGCTATGCCGTACATCA  
 TGATGTTCTTAGCTAACTAGAGGCTCTTGCTATGCCGTACATCA  
 CGATGCTCTTAGCBAACTTAGAGGACTTTGGTATGCCGTACATCA  
 TGATGTTCTTAGCBAACTTAGAGGACTTTGGTATGCCGTACATCA  
 TGATGCTCTTAGCTAACTAGAGGCTCTTGCTATGCCGTACATCA  
 TGATGCTCTTAGCTAACTAGAGGCTCTTGCTATGCCGTACATCA  
 AGATGTTCTTAGCTAACTAGAGGACTTTGGTATGCCGTACATCA  
 AGATGTTCTTAGCTAACTAGAGGACTTTGGTATGCCGTACATCA  
 \*\*\*\*\*

TERGZ-F

Enterococcus hirae  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Lactobacillus  
 Streptococcus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus

AATCATTCCACTTGCATGAAGAGTTCACCTGAATAGTCTCAGGA  
 AATCATTCCACTTGCATGAAGAGTTCACCTGAATAGTCTCAGGA  
 AATCATTCCACTTGCATGAAGAGTTCACCTGAATAGTCTCAGGA  
 AATCATTCCACTTGCATGAAGAGTTCACCTGAATAGTCTCAGGA  
 AATCATTCCACTTGCATGAAGAGTTCACCTGAATAGTCTCAGGA  
 AATCATTCCACTTGCATGAAGAGTTCACCTGAATAGTCTCAGGA  
 AATCATTCCACTTGCATGAAGAGTTCACCTGAATAGTCTCAGGA  
 AATCATTCCACTTGCATGAAGAGTTCACCTGAATAGTCTCAGGA  
 AATCATTCCACTTGCATGAAGAGTTCACCTGAATAGTCTCAGGA  
 \*\*\*\*\*

Enterococcus hirae  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Lactobacillus  
 Streptococcus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus

AAAAGTGACTGGGANTGATGAACGTCTCAAAAGAAATCATGACTT  
 AAAAGTGACTGGGANTGATGAACGTCTCAAAAGAAATCATGACTT  
 AAAAGTGACTGGGANTGATGAACGTCTCAAAAGAAATCATGACTT  
 AAAAGTGACTGGGANTGATGAACGTCTCAAAAGAAATCATGACTT  
 AAAAGTGACTGGGANTGATGAACGTCTCAAAAGAAATCATGACTT  
 AAAAGTGACTGGGANTGATGAACGTCTCAAAAGAAATCATGACTT  
 AAAAGTGACTGGGANTGATGAACGTCTCAAAAGAAATCATGACTT  
 AAAAGTGACTGGGANTGATGAACGTCTCAAAAGAAATCATGACTT  
 AAAAGTGACTGGGANTGATGAACGTCTCAAAAGAAATCATGACTT  
 \*\*\*\*\*

*Enterococcus hirae*  
*Enterococcus durans*  
*Enterococcus faecium*  
*Lactobacillus curvatus*  
*Lactobacillus brevis*  
*Streptococcus thermophilus*

Enterococcus hirae  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Lactobacillus  
 Streptococcus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus

GTTAGTAGTCTTCGAAAAAATGATGCAATCAAGCCATTCGACAC  
 GTTAGTAGTCTTCGAAAAAATGATGCAATCAAGCCATTCGACAC  
 GTTAGTAGTCTTCGAAAAAATGATGCAATCAAGCCATTCGACAC  
 GTTAGTAGTCTTCGAAAAAATGATGCAATCAAGCCATTCGACAC  
 GTTAGTAGTCTTCGAAAAAATGATGCAATCAAGCCATTCGACAC  
 GTTAGTAGTCTTCGAAAAAATGATGCAATCAAGCCATTCGACAC  
 GTTAGTAGTCTTCGAAAAAATGATGCAATCAAGCCATTCGACAC  
 GTTAGTAGTCTTCGAAAAAATGATGCAATCAAGCCATTCGACAC  
 GTTAGTAGTCTTCGAAAAAATGATGCAATCAAGCCATTCGACAC  
 \*\*\*\*\*

Enterococcus hirae  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Lactobacillus  
 Streptococcus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus

CTAGCGAAACATTTACAAATTAGGAAATGGTTAGTACCAAAAC  
 CTAGCGAAACATTTACAAATTAGGAAATGGTTAGTACCAAAAC  
 CTAGCGAAACATTTACAAATTAGGAAATGGTTAGTACCAAAAC  
 CTAGCGAAACATTTACAAATTAGGAAATGGTTAGTACCAAAAC  
 CTAGCGAAACATTTACAAATTAGGAAATGGTTAGTACCAAAAC  
 CTAGCGAAACATTTACAAATTAGGAAATGGTTAGTACCAAAAC  
 CTAGCGAAACATTTACAAATTAGGAAATGGTTAGTACCAAAAC  
 CTAGCGAAACATTTACAAATTAGGAAATGGTTAGTACCAAAAC  
 CTAGCGAAACATTTACAAATTAGGAAATGGTTAGTACCAAAAC  
 \*\*\*\*\*

TDEG-R1

Enterococcus hirae  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Enterobacter  
 Enterococcus  
 Lactobacillus  
 Streptococcus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus  
 Lactobacillus

AAACNTATTCATGGTAAAGCGAGTGAATCATGGTATCGGTTAGA  
 AAACNTATTCATGGTAAAGCGAGTGAATCATGGTATCGGTTAGA  
 AAACNTATTCATGGTAAAGCGAGTGAATCATGGTATCGGTTAGA  
 AAACNTATTCATGGTAAAGCGAGTGAATCATGGTATCGGTTAGA  
 AAACNTATTCATGGTAAAGCGAGTGAATCATGGTATCGGTTAGA  
 AAACNTATTCATGGTAAAGCGAGTGAATCATGGTATCGGTTAGA  
 AAACNTATTCATGGTAAAGCGAGTGAATCATGGTATCGGTTAGA  
 AAACNTATTCATGGTAAAGCGAGTGAATCATGGTATCGGTTAGA  
 AAACNTATTCATGGTAAAGCGAGTGAATCATGGTATCGGTTAGA  
 \*\*\*\*\*

252Pb