

La seguridad de los alimentos constituye una de las preocupaciones básicas en los países desarrollados ya que afecta directamente a la salud de todos los ciudadanos. Esta preocupación se ha visto incrementada en los últimos años debido a los graves incidentes ocurridos, que han convertido la seguridad alimentaria en un tema con gran repercusión social. En este contexto se sitúa la inquietud creciente, tanto por parte del consumidor como de las autoridades sanitarias, por la presencia de aquellos compuestos tóxicos que, como las aminas biógenas (AB), pueden aparecer en los alimentos. La investigación entorno a las AB se ha centrado en distintos aspectos, desde la visión toxicológica, al desarrollo de métodos de detección rápidos y sensibles, pasando por el estudio de los aspectos microbiológicos, bioquímicos y genéticos implicados en la síntesis de estas moléculas.

¿Qué son las aminas biógenas?

Las AB son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos. Atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) y en función del número de grupo aminos de la molécula, podemos hablar de monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina) (Figura 1).

Desde un punto de vista biológico, las AB son moléculas con funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos. En plantas, la putrescina y algunas poliaminas como la espermidina y la espermina, están implicadas en diversos procesos celulares de respuesta al estrés y al envejecimiento. En animales están implicadas en procesos tan relevantes como la división celular o la transmisión nerviosa. Así por ejemplo, la histamina actúa como neurotransmisor y la tiramina es un intermediario de las rutas de biosíntesis de otros neurotransmisores (ten Brink y cols., 1990).

Sin embargo, la descarboxilación de algunos aminoácidos, llevada a cabo por determinados microorganismos, puede provocar la presencia de concentraciones altas de AB en los alimentos, de forma que tras su ingestión pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos (Tabla 1).


Intoxicaciones alimentarias causadas por aminas biógenas

Las AB más frecuentes en alimentos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, β -feniletilamina, espermina y espermidina, si bien, las intoxicaciones alimentarias más frecuentes están relacionadas con la histamina y la tiramina, cuyos aminoácidos precursores son la histidina y tirosina, respectivamente. 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 del grupo *Escombroidae*. La intoxicación producida por tiramina se conoce también como reacción del queso, debido a los altos niveles que esta AB presenta en algunos quesos. Además de su propia toxicidad, estudios recientes han demostrado que la tiramina favorece la adhesión de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 a la mucosa intestinal (Lyte, 2004). Por otro lado, diaminas como putrescina y cadaverina pueden reaccionar con nitritos dando lugar a la formación de nitrosaminas de conocido efecto cancerígeno.

Cabe destacar que hay personas especialmente sensibles a las AB debido a que los enzimas responsables de su detoxificación, la monoamino oxidasa (MAO) o la diamino oxidasa (DAO) no son funcionales, bien por problemas genéticos o por la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos antidepresi-



vos. Por tanto, es difícil establecer los niveles tóxicos para cada una de las AB ya que depende de la eficacia de los sistemas de detoxificación y por lo tanto varía de unos individuos a otros. Además, también depende de la presencia de otras AB ya que pueden tener efectos sinérgicos. Sin embargo, aunque en la actualidad no existe una ninguna legislación sobre las concentraciones permitidas en los alimentos, las autoridades sanitarias recomiendan reducir al máximo la ingestión de estos compuestos. En el caso de personas con tratamientos antidepresivos basados en inhibidores de la MAO está contraindicado el consumo de queso, debido a los altos niveles de tiramina que puede contener. No obstante, es necesario subrayar que las concentraciones de AB varían no sólo de un tipo de alimento a otro, sino también dentro de un mismo tipo de alimento. Así por ejemplo, hemos



Las aminas biógenas en los alimentos

MARÍA FERNÁNDEZ Y MIGUEL A. ÁLVAREZ. INSTITUTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE ASTURIAS (CSIC).
CARRETERA DE INFUESTO, S/N. 33.300 VILLAVICIOSA. ASTURIAS.

encontrado dentro de un mismo tipo de queso, variaciones que van desde $90,75 \text{ mg kg}^{-1}$ hasta 2093 mg kg^{-1} , resultados similares han sido también descritos por otros autores (Roig-Sagués y cols., 2002)

La presencia de AB en alimentos debe de atribuirse a la acción microbiana sobre la fracción proteica de la materia prima y más específicamente a las reacciones de descarboxilación de los aminoácidos precursores llevadas a cabo por determinadas bacterias. Por lo tanto, hay dos factores clave para su acumulación en los alimentos: la presencia de las bacterias con actividad aminoacil-descarboxilasa y la disponibilidad de los sustratos de la reacción. El primero de estos factores se trata en los apartados siguientes. En cuanto al segundo, los alimentos que presentan una mayor posibilidad de contener AB son aquellos que contienen una elevada carga proteica, aunque también

en este aspecto será necesaria la intervención de los microorganismos y de su maquinaria proteolítica para liberar los aminoácidos precursores.

Las bacterias implicadas

En primer lugar hay que destacar que la presencia de actividad aminoacil-descarboxilasa implicada en la síntesis de AB, se trata de una característica de cepa y no de especie. Pueden ser bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y se pueden encontrar representantes en especies de diversos géneros como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Morganella*, *Vibrio* e incluso en bacterias GRAS ("General Regarded as Safe") como son las bacterias del ácido láctico (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* y *Lactococcus*.

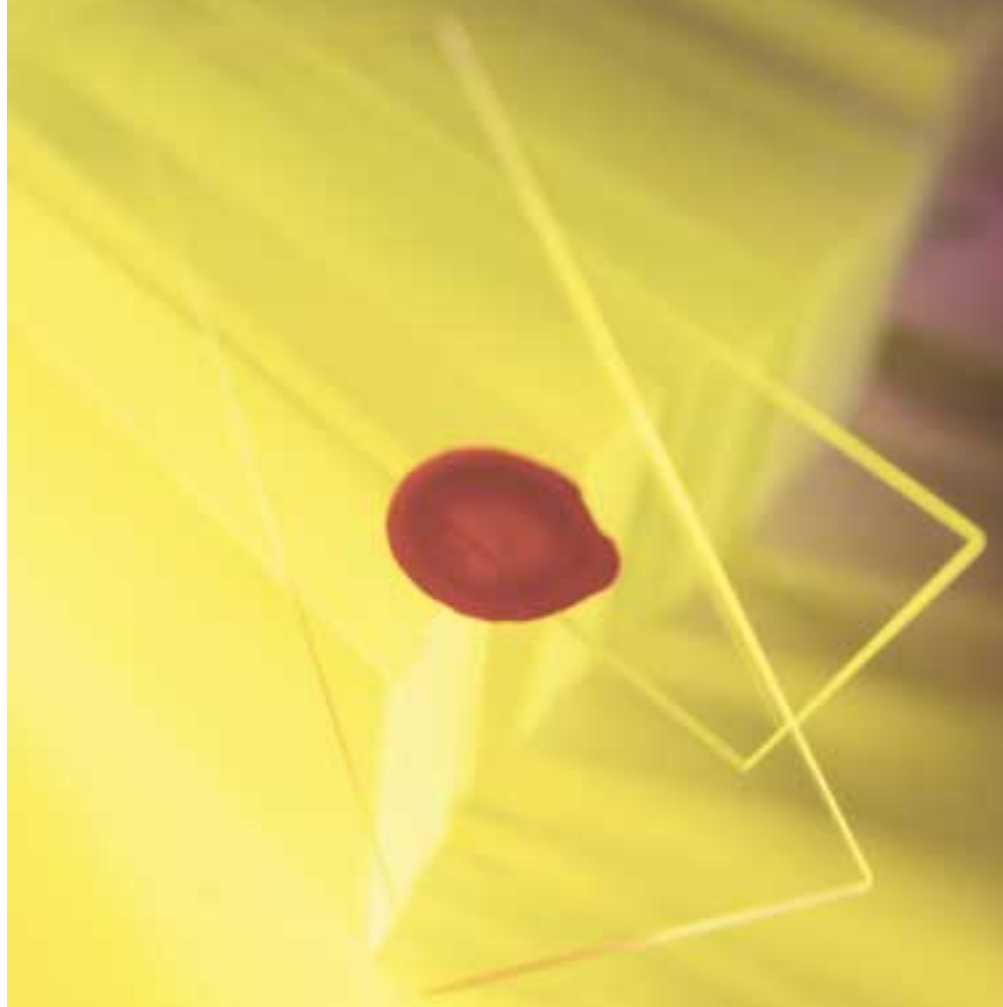
En el caso de alimentos no fermentados serán bacterias contaminantes, principalmente gram negativas, las responsables de la síntesis de AB. Algunos autores han sugerido que en este tipo de alimentos la concentración de AB podría ser considerada como un indicador de la carga microbiana. Por lo tanto, la solución pasa por una correcta manipulación y conservación de los alimentos, de forma que se evite la contaminación y proliferación microbiana.

Mención aparte merecen los alimentos y bebidas fermentados en los que intervengan BAL (vino, sidra, productos lácteos, vegetales, embutidos...) donde, además de a los microorganismos contaminantes, la actividad descarboxilasa puede estar asociada a las bacterias que forman parte del cultivo iniciador o de la microbiota secundaria. Por lo tanto, al igual que otros autores (Bacus, 1984; Bo-

ver-Cid y cols., 2000; Hernández-Jover y cols., 1997; Suzzi y Gardini, 2003), consideramos muy importante incluir entre los criterios de selección de los cultivos iniciadores, la incapacidad de sintetizar AB. De hecho, este criterio comienza a ser aplicado por algunas industrias francesas en la selección de las BAL utilizadas en la fermentaciones vnicas (Lonvaud-Funel, 2001).

La Bioquímica

El conocimiento de las condiciones favorables para la síntesis y actividad de las aminoacil-d Descarboxilasas, pasa por el estudio del papel fisiológico que la síntesis de AB tiene en las cepas productoras. La hipótesis más aceptada en la actualidad sugiere que las reacciones de descarboxilación podrían ser utilizadas por la célula para la obtención de energía y para el control del pH (Abe y cols., 1996; Konings y cols., 1995; Konings y cols., 1997). La descarboxilación de un aminoácido en el citoplasma y el transporte de la amina formada al exterior de la célula supondría, de forma indirecta, la expulsión de un protón al exterior, lo que permitiría controlar el pH intracelular. Además, el transporte de aminas generaría un gradiente electroquímico que podría ser utilizado por la célula para el transporte de nutrientes o para generar ATP a través de la F_1F_0 ATPasa (Figura 2). Algunos autores (Rhee y cols., 2002) sugieren que este sistema de descarboxilación podría favorecer el crecimiento en ambientes ácidos. En este sentido, Schelp y cols.



(2001) demostraron que el enzima histidina Descarboxilasa de *Lactobacillus* 30a es más activo a pH ácido.

La Genética

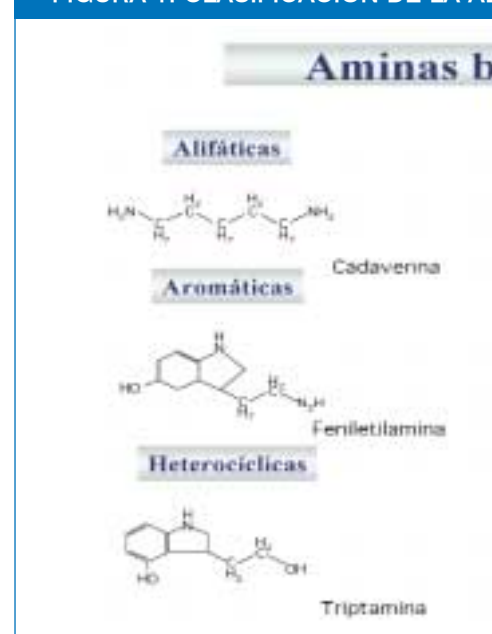
La presencia de una AB en los alimentos requiere de la expresión de al menos dos genes, el que codifica el enzima que cataliza la descarboxilación del aminoácidos correspondiente, y el que codifica una proteína transportadora implicada en el intercambio aminoácido /

AB. Estos genes tienen que estar perfectamente regulados ya que su sustrato, los aminoácidos, son los componentes de las proteínas. Por lo tanto, la célula debe evitar su descarboxilación si no está asegurado el aporte suficiente para la síntesis de proteínas. Además, parecen estar inducidos por valores bajos de pH en el medio. Los datos genéticos que se tienen hasta el momento, han revelado que los genes que codifican estas dos proteínas se encuentran formando parte de un gru-

TABLA 1: AMINAS BIÓGENAS EN ALIMENTOS Y SUS EFECTOS FARMACOLÓGICOS, TOMADA DE SHALABY (1996)

Amina biógena	Efectos tóxicos
Histamina	Síntesis de noradrenalina y adrenalina Palpitaciones Vómitos, nauseas
Tiramina	Hipertensión Migrañas Vasoconstricción Lacrimación y salivación Incrementa el nivel de azúcar en la sangre Parálisis de las extremidades
Putrescina y cadaverina	Rigidez mandibular Bradycardia Hipotensión Potencia el efecto de otras aminas
β -feniletilamina	Hipertensión Migrañas
Triptamina	Hipertensión

FIGURA 1: CLASIFICACIÓN DE LA AB





po de genes en el que también suelen estar presente un tercer gen que codifica una proteína reguladora (Nelly y Olson 1996). En el caso de la histamina y de la tiramina, se encuentra un tercer gen que codifica una proteína similar a aminoacil t-RNA sintetetas y que podría tener función reguladora, actuando como un sensor del aminoácido correspondiente (Fernández y cols., 2004; Martín y cols., 2005). La organización de algunos de los genes secuenciados que están implica-

dos en la síntesis de AB se resume en la figura 3.

Métodos de detección

Los métodos de detección de AB en los alimentos se han ido desarrollando de forma paralela al desarrollo de la cromatografía. Inicialmente, se determinaba su presencia mediante cromatografía en capa fina, pero este método no permitía la cuantificación. Con el fin de mejorar la sensibilidad y hacer posible la cuantifica-

ción, se desarrollaron una serie de técnicas que se basan en la separación y la resolución mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Estas técnicas se fueron optimizando gracias al empleo de pre-columnas y a la derivatización de la muestras con distintos compuestos (Krause y cols., 1995; Novella-Rodriguez y cols., 2000). Para algunas AB se han desarrollado otras técnicas alternativas como la electroforesis capilar (Lange y cols., 2002 a; Cinquina y cols., 2004) o los métodos enzimáticos basados en las actividades monoamino y diamino oxidasa (Lange y cols., 2002 b). Todas estas técnicas requieren un primer paso de extracción de los compuestos a analizar y, teniendo en cuenta que las muestras de alimentos son matrices muy complejas, estos procesos de extracción son en muchas ocasiones largos y laboriosos. Además, el análisis realizado en un momento determinado no excluye que estos compuestos puedan formarse en fases posteriores cuando se alcanzan en el alimento los valores de pH y la concentración de los sustratos adecuada para la síntesis de las AB. Este aspecto es especialmente crítico en alimentos fermentados, en los que los iniciadores continúan su actividad durante largos periodos de tiempo. Por ello, un método alternativo de control de la presencia de AB en alimentos se basa en la detección de cepas potencialmente productoras. Inicialmente los métodos utilizados se basaban en la capacidad de hidrólisis del aminoácido precursor en un medio de cultivo (Bover-

SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA

Biogénas

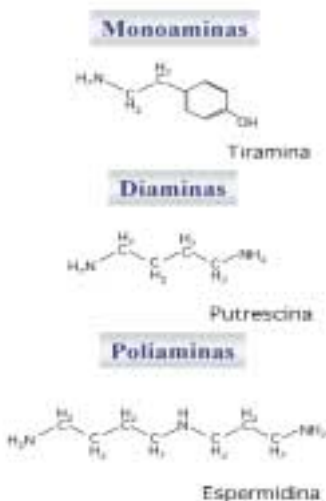
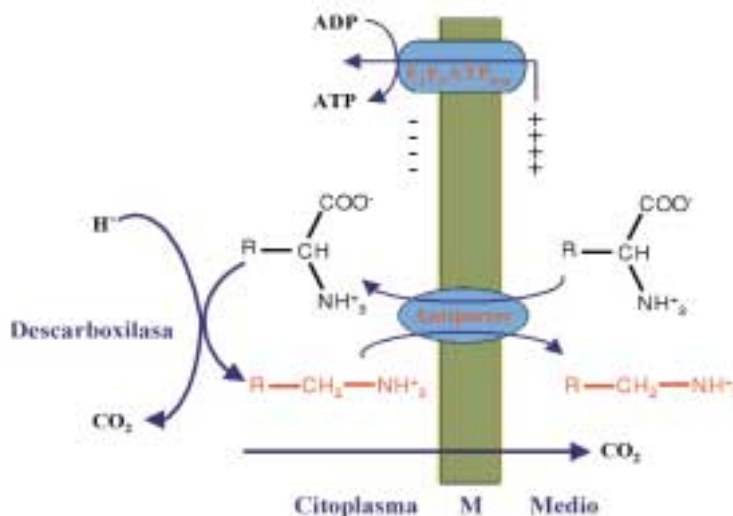


FIGURA 2

Papel fisiológico de la síntesis de AB en las bacterias productoras. La descarboxilación de un aminoácido en el citoplasma y el transporte de la amina formada al exterior de la célula permitiría controlar el pH intracelular. Además, el gradiente electroquímico generado podría ser utilizado para generar ATP a través de la F_1F_0 ATPasa.



Cid y cols., 1999). Pero este método requiere el aislamiento de los microorganismos a partir de los alimentos y su crecimiento en el medio diferencial, todo ello hace que sea muy largo y tedioso, dificultando su utilización de forma rutinaria. Surge por lo tanto la necesidad de desarrollar un método rápido, fácil y sensible de detección de cepas productoras de AB en muestras de alimentos.

PCR: la herramienta maravillosa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por el Dr. Kary B. Mullis, el cual fue galardonado con el premio Nóbel de química en el año 1993 por esta trascendental técnica. Básicamente es un método enzimático que nos permite hacer muchas copias de un fragmento específico de DNA. Este proceso se conoce como amplificación del DNA. Para ello se utilizan dos oligonucleótidos cebadores o "primers", cuya secuencia es complementaria a los extremos del fragmento de DNA que pretendemos amplificar y que por tanto son los responsables de la especificidad del proceso. El primer paso consiste en subir la temperatura para que se separen las dos hebras del DNA original. Después se baja la temperatura para que se unan los "primers" en sus sitios específicos y así la DNA polimerasa pueda sintetizar la cadena complementaria. Estos ciclos se repiten sucesivamente en un termociclador, de forma que en cada uno de ellos se duplica el número de copias del DNA diana. De esta forma, partiendo de una única molécula inicial de DNA, en 35 ci-



clos obtendríamos 34 mil millones de copias (Figura 4).

La PCR es sin duda una alternativa y de hecho ya se utiliza con éxito en la detección de microorganismos alterantes y patógenos en alimentos (revisión Hill, 1996; Rudi y cols., 2002; Malorny y cols., 2003).

En el caso de las AB las investigaciones se han centrado principalmente en la histamina (Le Jeune y cols., 1995) y en la tiramina. En nuestro grupo del Instituto de Productos Lácteos de Asturias nos hemos centrado en la tiramina debido a que es, con diferencia, la AB más abun-

dante en quesos, llegando a alcanzar concentraciones realmente alarmantes. Se han diseñado los oligonucleótidos cebadores y se han optimizado las condiciones que permiten la amplificación específica de un fragmento interno del gen de la tirosina descarboxilasa (Fernández y cols., 2004). Este procedimiento permite comprobar que las cepas seleccionadas para usar como fermentos sean incapaces de sintetizar tiramina. Como ya hemos indicado nos parece imprescindible incluir la incapacidad de sintetizar AB como criterio de selección de los cultivos

FIGURA 3: ORGANIZACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE LAS AB MÁS FRECUENTES EN ALIMENTOS

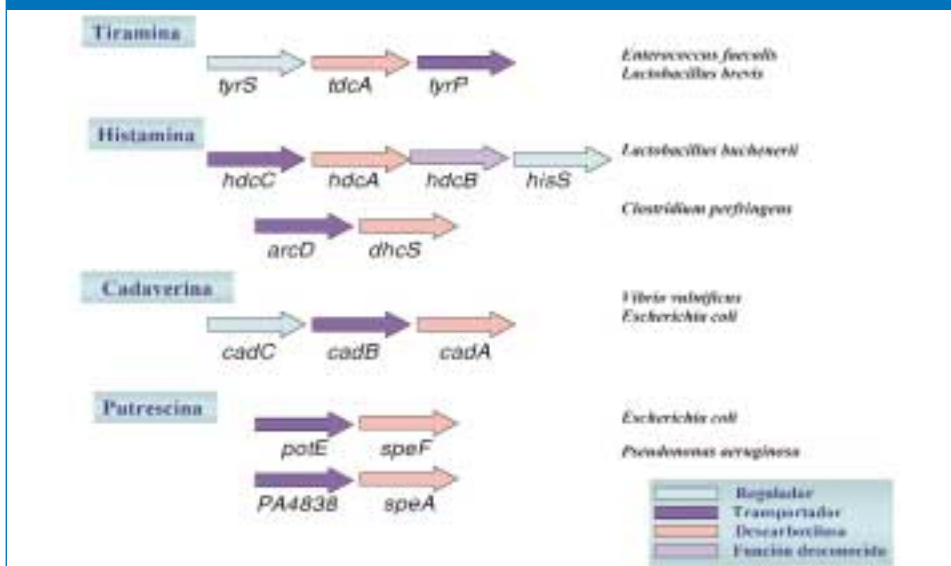
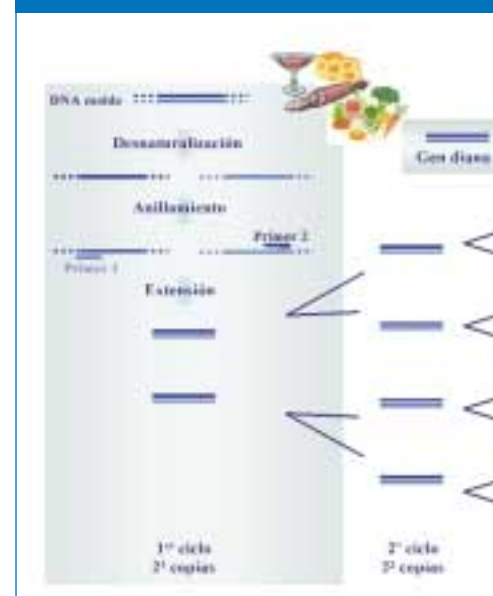


FIGURA 4: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)





lo cual sería especialmente útil para aquellas personas que por cualquier razón sean deficientes en las actividades MAO y DAO.

En la actualidad, estamos desarrollando la detección de cepas productoras de AB por PCR a tiempo real. Esta técnica, aún más rápida y sensible que la PCR convencional, permitiría además su cuantificación.

Agradecimientos

El proyecto que estamos realizando sobre AB ha sido financiado por la Unión Europea (QLRT-2001-02388).

Bibliografía

- Abe, K., Hayashi, H., y Maloney, P.C. (1996). Exchange of aspartate and alanine. Mechanism for development of a proton-motrice force in bacteria. *J. Biol. Chem.* 271:3079-3084.
- Bacus, J. (1984). Update: meat fermentation. *Food Technol.* 38:59-63.
- Bover-Cid, S., y Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., y Vidal-Carou, M.C. (2000). Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. *J. of Food Prot.* 63:237-243.
- Cinquina, A.L., Longo, F., Cali, A., De Santis, L., Baccelliere, R., y Cosan, R. (2004). Validation and comparison of

iniciadores. Esta técnica también permite detectar de forma específica, rápida, sencilla y barata, bacterias productoras de tiramina aunque estén en muy baja concentración. Además, la reacción de PCR ha sido optimizada con éxito para poder detectar estas bacterias en muestras de alimentos. Así por ejemplo, se ha podido seguir su presencia en todos los pasos de elaboración (leche cruda, cuajada y distintas etapas del proceso de maduración) de un queso artesanal (Figura 5). Todas las muestras fueron paralelamente analizadas mediante HPLC y se pudo compro-

bar que aunque en los pasos iniciales de la elaboración no se detectó tiramina, se llegaron a alcanzar concentraciones altísimas, de más de 2.000 mg kg⁻¹ en el producto final. En cambio, mediante PCR ya se pudo detectar la presencia de los microorganismos productores en la leche cruda. La ausencia de estas bacterias sería la mejor garantía de que un alimento como el queso, con alta probabilidad de presentar tiramina, está libre de esta AB a lo largo de toda la cadena alimentaria. Por lo tanto, esta técnica permitiría certificar la ausencia de AB en los alimentos,

PRINCIPALES PASOS DE LA POLIMERASA (PCR)

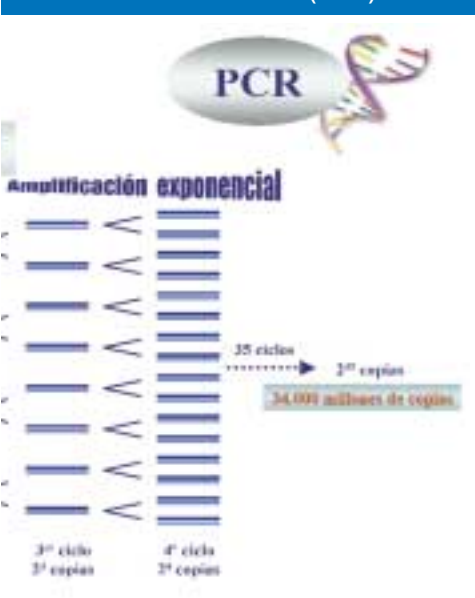
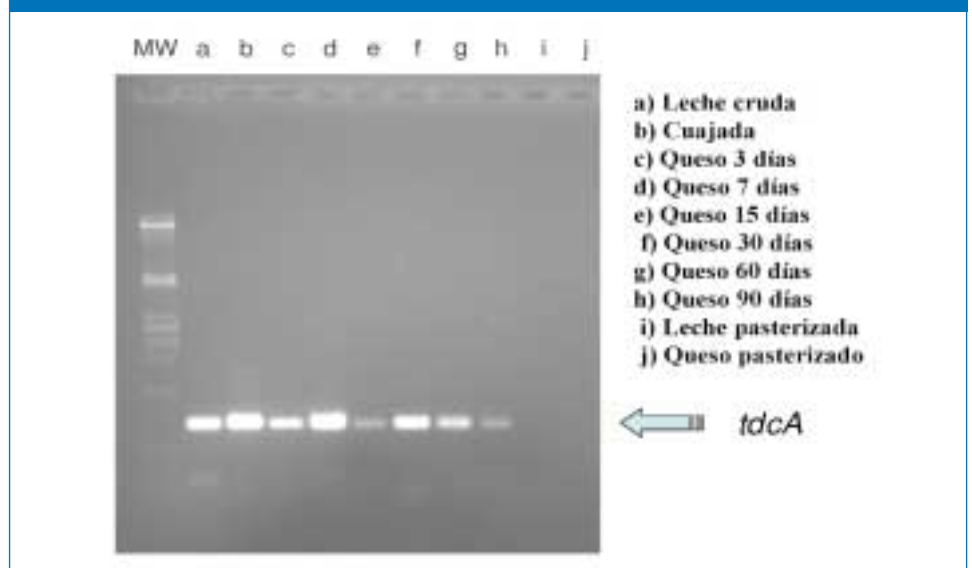


FIGURA 5: DETECCIÓN MEDIANTE PCR DE CEPAS PRODUCTORAS DE TIRAMINA EN LOS DISTINTOS PASOS DE ELABORACIÓN DE UN QUESO



- analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. *J Chromatogr A*. 1032:79-85.
- Fernández M., Linares, D.M. y Alvarez, M.A. (2004). Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 67:2521-2529.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., y Vidal-Carou, M.C. (1997). Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. *J. Food Prot.* 60: 825-830.
- Hill, W.E. (1996). The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 36:123-73.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., y Poolman, B. (1995). The generation of metabolic energy by solute transport. *Arch. Microbiol.* 164:235-242.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B., y Driessen, A.J. (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:117-128.
- Krause, I., Bockhardt, A., Neckermann, H., Henle, T., y Klostermeyer, H. (1995). Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high performance liquid chromatography of the dansyl derivatives. *J. Chromatogr. A*. 715:67-79.
- Lange, J., Thomas, K., y Wittmann, C. (2002) a. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 779:229-39.
- Lange, J., y Wittmann, C. (2002) b. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 372:276-283.
- Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., Ten Brink, B., Hofstra, H., y Van der Vossen, J.M.B.M. (1995). Development of a detection system for histamine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activities test. *J. Appl. Bacteriol.* 78:316-326.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 199:9-13.
- Lyte, M. (2004). The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa. *J. of Food Prot.* 6:878-883.
- Malorny, B., Tassios, P.T., Radstrom, P., Cook, N., Wagner, M., y Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 25:39-48.
- Martín, M.C., Fernández, M., Linares, D.M. y Alvarez, M.A. (2005). Sequencing, characterisation and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology* (en prensa).
- Neely, M., y Olson, E.R. (1996). Kinetics of expression of the *Escherichia coli cad* operon as a function of pH and lysine. *J. Bacteriol.* 178:5522-5528.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T., y Vidal-Carou, M.C. (2000). Biogenic amines and polyamines in miles and cheeses by ion-pair High Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 48:5117-5123.
- Rhee, J.E., Rhee, J.H., Ryu, P.Y., y Choi, S.H. (2002). Identification of the *cadBA* operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 208:245-251.
- Roig-Sagués, A.X., Molina, A.P., y Hernández-Herrero, M.M. (2002). Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 215:96-100.
- Rudi, K., Nogva, H.K., Moen, B., Nissen, H., Bredholt, S., Moretro, T., Naterstad, K., y Holck, A. (2002). Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in foods. *Int J Food Microbiol.* 78:171-80.
- Schelp, E., Worley, S., Monzingo, A.F., Ernst, S., y Robertus, J.D. (2001). pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. *J. Mol. Biol.* 306:727-732.
- Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. International.* 29:675-690.
- Suzzi, G., y Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88:41-54.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., y Huis in't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in food. *Int. J. Food Microbiol.* 11:73-84. ■

AgroCSIC

CENTRO DEL CSIC: Instituto de Productos Lácteos de Asturias.

Nombre Investigador: Miguel Angel Álvarez González.

E-mail: maag@ipla.csic.es

Tendencias de investigación:

Nuestra investigación se centra principalmente en las bacterias del ácido láctico y abarca los siguientes aspectos:

- Bacteriófagos y mecanismos de resistencia.
- Desarrollo de herramientas genéticas de grado alimentario.
- Las bacterias del ácido láctico como vectores de vacunación oral.
- Rutas de descarboxilativas: aminas biogénicas.

