



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“PRODUCCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS Y SUSCEPTIBILIDAD A
GERMICIDAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE
ALIMENTOS FERMENTADOS”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

IBQ. XOCHITL YAMILET OVALLE MARMOLEJO

DIRIGIDO POR

DRA. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO

Querétaro, Qro. A 21 de mayo de 2021

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**PRODUCCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS Y SUSCEPTIBILIDAD
A GERMICIDAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS
DE ALIMENTOS FERMENTADOS**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

IBQ. Xochitl Yamilet Ovalle Marmolejo

Dirigido por

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

SINODALES

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Presidenta

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Secretario

Dr. Mauricio Redondo Solano

Vocal

Dr. Ramón Martínez Peniche

Suplente

Dra. Marcela Gaytán Martínez

Suplente

Querétaro, Qro.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Xochitl Yamilet Ovalle Marmolejo

INDICE GENERAL

| | |
|--|------------|
| INDICE GENERAL | I |
| RESUMEN | VI |
| ABSTRACT | VII |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Alimentos fermentados | 3 |
| 2.2 Consumo de alimentos fermentados | 4 |
| 2.2.1 La cerveza..... | 5 |
| 2.2.2 El vino tinto..... | 6 |
| 2.2.3 El queso..... | 8 |
| 2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL) | 8 |
| 2.3.1 Características..... | 8 |
| 2.3.2 Identificación e aislamiento..... | 9 |
| 2.4 Aminas biogénicas | 9 |
| 2.3.2 Biosíntesis de AB..... | 11 |
| 2.3.3 Efectos nocivos en el humano..... | 13 |
| 2.4 Presencia de AB en alimentos | 17 |
| 2.4.1 AB en Cerveza..... | 19 |
| 2.4.2 AB en queso..... | 20 |
| 2.4.3 AB en los vinos..... | 21 |
| 2.6 Detección de BAL productoras de AB | 22 |
| 2.7 Determinación de AB | 22 |
| 2.8 Prevención de la formación de AB en alimentos | 23 |
| 2.8.1 Desinfección química..... | 24 |
| II. JUSTIFICACIÓN | 27 |
| IV. HIPÓTESIS | 28 |
| IV. OBJETIVOS | 29 |
| V. METODOLOGÍA | 30 |
| 5.1 Materiales | 30 |
| 5.2 Métodos | 31 |
| 5.2.1 Estrategia general del proyecto | 31 |
| 5.2.2 Procedimientos generales | 32 |
| 5.2.3 Aislamiento de BAL presentes en alimentos fermentados como queso madurado, cerveza y vino tinto | 33 |
| 5.2.4 Detección de genes asociados a la producción de AB en cepas de BAL . | 34 |
| 5.2.5 Determinación de las condiciones y factores en el alimento que pueden influenciar la producción de aminas biogénicas por cepas de BAL | 38 |

| | |
|---|-------------------|
| <u>5.2.6 Evaluación de la susceptibilidad de diversas cepas de BAL ante la acción de germicidas en superficies de acero inoxidable</u> | <u>41</u> |
| <u>5.2.7 Análisis estadístico</u> | <u>43</u> |
| <u>VI. RESULTADOS Y DISCUSION</u> | <u>44</u> |
| <u>6.1 Aislamiento e identificación de cepas de BAL a partir de quesos artesanales madurados, cerveza y vino tinto artesanal</u> | <u>44</u> |
| <u>6.2 Evaluación del efecto de diversos factores propios del alimento que pueden influenciar el desarrollo de BAL y la producción de AB</u> | <u>51</u> |
| <u>6.3 Cinética de BAL, parámetros físicos y químicos durante la fermentación alcohólica de mosto de cebada</u> | <u>77</u> |
| <u>6.4 Evaluación de susceptibilidad de BAL productoras y no productoras de AB ante germicidas comúnmente empleados en la industria</u> | <u>82</u> |
| <u>VII. CONCLUSIONES</u> | <u>93</u> |
| <u>VIII. REFERENCIAS</u> | <u>94</u> |
| <u>XI.- ANEXOS</u> | <u>104</u> |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|------------------|
| <u>Figura 1. Clasificación de aminas biogénicas de acuerdo a su estructura química.....</u> | <u>10</u> |
| <u>Figura 2. Formación de aminas biogénicas a partir de aminoácidos libres. .</u> | <u>11</u> |
| <u>Figura 3. Mecanismo de acción de AB en el humano.....</u> | <u>14</u> |
| <u>Figura 4. Evolución del número de brotes anuales por histamina en EE.UU.</u> | <u>17</u> |
| <u>Figura 5. Número de brotes mensuales por histamina en EE.UU.....</u> | <u>17</u> |
| <u>Figura 6. Desglose porcentual de las investigaciones con aminas biogénicas relacionadas con productos alimenticios publicadas 2010-2016.</u> | <u>19</u> |
| <u>Figura 7. Esquema general de trabajo para la realización del proyecto.....</u> | <u>32</u> |
| <u>Figura 8. Identificación de aislados a partir de queso y cerveza mediante PCR.....</u> | <u>46</u> |
| <u>Figura 9. Productos de la prueba PCR múltiplex dirigida a genes asociados a la producción de aminas biogénicas.....</u> | <u>49</u> |
| <u>Figura 10. Desarrollo de BAL aisladas de cerveza en CMRS ajustado a diferentes concentraciones de etanol.....</u> | <u>53</u> |
| <u>Figura 11. Desarrollo de BAL aisladas de cerveza en CMRS ajustado a diferentes niveles de pH.....</u> | <u>54</u> |
| <u>Figura 12. Correlación entre el desarrollo de BAL evaluado en CMRS ajustado a pH 4 y en CMRS ajustado a 8% de etanol.....</u> | <u>55</u> |
| <u>Figura 13. Correlación entre el desarrollo de BAL evaluado en CMRS ajustado a pH 5 y en CMRS ajustado a 8% de etanol.....</u> | <u>56</u> |
| <u>Figura 14. Desarrollo de BAL aisladas a partir de quesos madurados en CMRS ajustado a diferentes concentraciones de NaCl.....</u> | <u>57</u> |
| <u>Figura 15. Desarrollo de BAL aisladas a partir de quesos madurados en CMRS ajustado a diferentes niveles de pH.....</u> | <u>58</u> |
| <u>Figura 16. Desarrollo de BAL aisladas a partir de cerveza en CMRS ajustado a diferentes niveles de pH y distintas concentraciones de etanol.....</u> | <u>61</u> |
| <u>Figura 17. Desarrollo de BAL aisladas a partir de queso en CMRS ajustado a diferentes niveles de pH y distintas concentraciones de NaCl.....</u> | <u>64</u> |
| <u>Figura 18. Mapa de calor de producción de AB (mg/L) por cepas de BAL aisladas a partir de cerveza bajo tres tratamientos diferentes.....</u> | <u>68</u> |

| | |
|---|------------------|
| <u>Figura 19. Interacción cepa-tratamiento en la producción de histamina por BAL aisladas de cerveza.....</u> | <u>69</u> |
| <u>Figura 20. Gráfico de interacción cepa-tratamiento en la producción de tiramina por BAL aisladas de cerveza.....</u> | <u>71</u> |
| <u>Figura 21. Mapa de calor de producción de AB (mg/L) por cepas de BAL aisladas a partir de quesos madurados bajo tres tratamientos diferentes.....</u> | <u>74</u> |
| <u>Figura 22. Gráfico de interacción cepa-tratamiento en la producción de histamina por BAL aisladas de quesos madurados.....</u> | <u>75</u> |
| <u>Figura 23. Gráfico de cinéticas de parámetros físicos y químicos a lo largo de la fermentación alcohólica de mosto de cebada inoculado con BAL productoras de AB.....</u> | <u>79</u> |
| <u>Figura 24. Gráfico de sobrevivencia de BAL durante el proceso de fermentación alcohólica de mosto de cebada para el proceso de elaboración de cerveza.....</u> | <u>81</u> |
| <u>Figura 25. Reducción logarítmica de las poblaciones de BAL aisladas de cerveza por diversos germicidas.....</u> | <u>85</u> |
| <u>Figura 26. Reducción logarítmica de las poblaciones de BAL aisladas a partir de quesos por diversos germicidas.....</u> | <u>87</u> |
| <u>Figura 27. Gráfico de interacción entre cepas de BAL productoras/no productoras de aminas biogénicas y los germicidas.....</u> | <u>90</u> |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| <u>Tabla 1. Efecto fisiológico y toxicológico de las AB. (Triki, 2013).</u> | <u>15</u> |
| <u>Tabla 2 Numero de reportes asociados al consumo de histamina en el periodo 2008-2018 (CDC, 2020).</u> | <u>16</u> |
| <u>Tabla 3. Características de los iniciadores para la detección de los genes de BAL asociado a la producción de AB.</u> | <u>35</u> |
| <u>Tabla 4. Iniciadores de PCR Múltiple para BAL.</u> | <u>36</u> |
| <u>Tabla 5. Condiciones de PCR Múltiple.</u> | <u>37</u> |
| <u>Tabla 6. Factores y tratamientos de estudio en cepas aisladas de cerveza.</u> | <u>38</u> |
| <u>Tabla 7. Factores y tratamientos de estudio en cepas aisladas de queso.</u> | <u>38</u> |
| <u>Tabla 8. Concentraciones de germicidas a usar.</u> | <u>42</u> |
| <u>Tabla 9. Identificación mediante PCR de BAL aisladas a partir de alimentos fermentados.</u> | <u>47</u> |
| <u>Tabla 10. BAL aisladas de con genes asociados a producción de AB, aisladas a partir de quesos madurados y cerveza artesanales.</u> | <u>50</u> |
| <u>Tabla 11. Valores de p obtenidos en el análisis de varianza para la producción de histamina por BAL aisladas de cerveza para los principales efectos y sus interacciones.</u> | <u>68</u> |
| <u>Tabla 12. Valores de p obtenidos en el análisis de varianza para la producción de tiramina por BAL aisladas de cerveza para los efectos principales y sus interacciones.</u> | <u>71</u> |
| <u>Tabla 13. Valores de p obtenidos en el análisis de varianza para la producción de histamina por BAL aisladas a partir de quesos madurados para los principales efectos y sus interacciones.</u> | <u>75</u> |
| <u>Tabla 14. Valores de p obtenidos en el ANDEVA para la reducción en poblaciones de BAL aisladas a partir de queso madurado y cerveza artesanal para los principales efectos y sus interacciones.</u> | <u>89</u> |
| <u>Tabla 15. Capacidad de formación de biopelículas por parte de BAL aisladas de quesos madurados y cervezas artesanales.</u> | <u>92</u> |

RESUMEN

El crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) en alimentos fermentados podría asociarse a la producción de aminas biogénicas (AB). Las AB inducen efectos negativos de salud, que van desde dolor de cabeza, vómitos y urticaria, hasta infartos y derrames cerebrales. Las BAL pueden adherirse a superficies, lo cual podría promover la contaminación de los alimentos y tolerancia a germicidas. El objetivo de esta investigación fue identificar los factores relevantes para la producción de AB por BAL en alimentos y generar información sobre su control en la producción de algunos alimentos fermentados. Se aislaron 45 cepas de BAL a partir de queso artesanal madurado; a partir de estas cepas, más otras previamente aisladas de cerveza y vino (25), se identificaron mediante ensayos de PCR multiplex, dieciocho cepas de BAL (83.3% de cerveza, 16.6% de queso) con genes asociados a la producción de AB pertenecientes a tres géneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Lactobacillus*. Se evaluó el desarrollo de estas BAL por densidad óptica en medio de cultivo ajustado a tres niveles de pH, concentración de alcohol y NaCl. La concentración de AB (histamina, tirosina, cadaverina y putrescina) se determinó por HPLC en los diferentes tratamientos. Seis cepas mostraron capacidad de producir una o más de las AB estudiadas; el pH de 4 fue el más propicio para la producción de histamina (cepas de queso y cerveza) y pH 5 para tiramina (cepas de cerveza). Se evaluó la sobrevivencia de BAL productoras y no productoras de AB durante la producción de cerveza, las BAL(6 Log) tendieron a disminuir durante el proceso de fermentación, pero persistieron y al final del proceso se recuperaron 1.6 Log de BAL. Finalmente, se evaluó la susceptibilidad de cepas de BAL seleccionadas a agua electrolizada, ácido peracético, cloro y detergente esterClean. El ácido peracético y cloro (80 y 200ppm, respectivamente) lograron la mayor reducción (2.6 LogUFC) en cepas de BAL y no se observó diferencia significativa entre la susceptibilidad de BAL productoras y no productoras de AB.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, aminas biogénicas, alimentos fermentados, desinfección.

ABSTRACT

The growth of acid lactic bacteria (LAB) in fermented foods could be associated with the production of biogenic amines (BA). BA induces negative health effects, beginning from headaches, vomiting, and hives, to heart attacks and strokes. LAB can be adhering to surfaces, which could promote food contamination and generate tolerance to germicides in LAB. The objective of this research was to identify the relevant factors for the AB production by BAL in foods, and to generate information about their control in the production of fermented foods. BAL strains were isolated from ripened artisan cheeses, obtained from producing establishments in the state of Querétaro, Mexico; From these strains, plus others previously isolated from beer and wine, eighteen LAB strains (83.3% beer, 16.6% cheese) with genes associated with the production of BA belonging to three genera were identified by multiplex PCR assays. Subsequently, the development of BAL was evaluated by optical density in culture medium adjusted to three levels of pH, concentration of alcohol and NaCl. The concentration of AB (histamine, tyrosine, cadaverine and putrescine) was determined by HPLC in the different treatments. Six strains showed the ability to produce one or more of the BA studied; pH 4 was the optimal to histamine production (cheese and beer strains) and pH 5 for tyramine (beer strains). The survival of AB-producing LAB during beer production was evaluated, the LAB population (6 initial Log) decreased along fermentation process, but 1.6 Log of BAL were recovered at the end of the process. Finally, the susceptibility of selected LAB strains to electrolyzed water, peracetic acid, chlorine and esteriClean detergent was evaluated. Peracetic acid and chlorine (80 and 200ppm) achieved the greatest LAB strains reduction (2.6 LogUFC). No significant difference was observed between the susceptibility of BA-producers and non-producers strains.

Key words: acido lactic bacterial, biogenic amines, fermented foods, disinfection

I. INTRODUCCIÓN

Cuando el ser humano se volvió sedentario se vio en la necesidad de conservar los alimentos y descubrió que en algunos casos estos se transformaban en productos que no sólo resultaban estables, sino que además eran agradables al gusto y no enfermaban a quien los consumía. Se piensa que fue así como empezaron los procesos para producir alimentos fermentados, los cuales vinieron a dar una importante variedad nutricional a la dieta; con el tiempo, se lograron importantes avances como los cultivos iniciadores que permiten producir estos alimentos en condiciones controladas.

Actualmente el consumo de alimentos fermentados como la cerveza y el queso, elaborados a partir de cultivos iniciadores han tomado gran popularidad y generalmente son considerados como alimentos seguros debido a que sus características químicas limitan la sobrevivencia y desarrollo de microorganismos patógenos. Sin embargo, estudios previos han evidenciado que microorganismos propios del alimento como las bacterias ácido lácticas (BAL) bajo ciertas condiciones son capaces de producir compuestos químicos tales como las aminos biogénicas (AB), los cuales se asocian con daños a la salud de los consumidores.

Las afecciones que pueden generar las AB son diversas, y depende de varios factores, como lo son: tipo de amina biogénica consumida, dosis, consumo de alcohol y metabolismo del individuo que la consume. Los individuos que consumen AB pueden presentar desde síntomas simples como lo son cefalea, migraña, urticaria, sudoración, taquicardia, entre otros, hasta graves complicaciones como anafilaxia y hemorragias cerebrales y arteriales (Triki, 2013).

Un alimento que contiene BAL, no forzosamente presenta AB, pues se ha demostrado que no todas las cepas poseen los genes que las capacitan para sintetizar dichos compuestos. La producción de AB se ha señalado como un mecanismo de respuesta de las BAL ante un bajo nivel de pH u otro tipo de condiciones adversas del entorno en el cual se encuentran, como las que prevalecen en los alimentos fermentados; por ello los factores intrínsecos del

alimento y del ambiente pueden influir en la producción de estos compuestos, en particular el pH, la concentración de sal, el contenido de etanol y la temperatura. Estos factores pueden ser modulados para prevenir o minimizar la producción de AB por parte de BAL con lo que se promueve la inocuidad del alimento.

Una fuente importante de las BAL en las empresas productoras de alimentos suelen ser las superficies de los equipos de producción; el contacto con estas superficies contaminadas podría incorporar al producto cepas con diferentes capacidades metabólicas, que pueden aumentar el riesgo de presencia de AB. Por esta razón es necesario prevenir la contaminación con BAL provenientes de los equipos, así como la formación de AB en el producto. Se reconoce que un buen proceso de saneamiento de los equipos coadyuva a la inocuidad y larga vida útil de los alimentos producidos, así pues, la eficiencia del saneamiento de equipos es fundamental para los productores de alimentos fermentados.

El presente trabajo pretende caracterizar la capacidad de producción de AB por parte de BAL aisladas de productos fermentados y su tolerancia ante germicidas de uso común en la industria.

II. ANTECEDENTES

2.1 Alimentos fermentados

La fermentación, al ser una tecnología de bajo costo, desempeña un papel importante como aplicación biotecnológica del procesamiento de alimentos en muchos países en desarrollo. Una gran variedad de productos fermentados se produce a partir de alimentos como: la leche, cereales, frutas y cultivos de raíces con almidón. Los beneficios asociados con la fermentación incluyen, entre otras: mejora de las propiedades sensoriales y el valor nutricional de los alimentos, la reducción de los factores tóxicos y antinutricionales, así como la mejora de la inocuidad y vida útil de los productos (Misihairabgwi *et al.*, 2017).

Se conoce que los alimentos fermentados poseen propiedades nutricionales y terapéuticas especiales, pues los cultivos iniciadores producen mayor cantidad de aminoácidos libres, facilitando así la digestión y la asimilación de los nutrientes. Además, las BAL empleadas para el proceso de fermentación son beneficiosas para la microbiota intestinal, actúan como una barrera ecológica, estimulan las defensas naturales del cuerpo incitando la producción de interferón, proteína que inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos; además, estas bacterias reducen los compuestos tóxicos como las aflatoxinas y cianógenos, producen factores antimicrobianos como ácido láctico, bacteriocinas, bióxido de carbono, agua oxigenada y etanol, que facilitan la inhibición o eliminación de los patógenos, es decir, por medio de diversos mecanismos las BAL favorecen la inocuidad de los alimentos (Picón, 2019).

La fermentación, además de sus virtudes nutritivas, inocuidad y conservación, enriquece la dieta a través de la producción de una variedad de sabores, texturas y aromas. El proceso, prolonga la duración de los alimentos a la vez que reduce el consumo de energía necesaria para prepararlos. La producción

de alimentos fermentados también es importante para sumar valor a las materias primas agrícolas, y así proporciona ingresos y crea empleos (FAO, 1998).

Es común que los microorganismos de un alimento fermentado constituyan una microbiota compleja, constituida por una gran cantidad y diversidad de microorganismos. Recientemente, en algunos productos fermentados modernos se ha logrado determinar aquellos microorganismos que son clave para el proceso fermentativo. El conocimiento de los microorganismos clave en el proceso fermentativo permite su manipulación a nivel de laboratorio, de manera que se puedan añadir en el producto después de que la materia prima ha sido sometida a tratamientos destinados a eliminar agentes patógenos y de deterioro (Wachwer, 2014). Algunos de los microorganismos fermentadores se mantienen viables en el producto al igual que sus metabolitos, que realizan funciones específicas beneficiosas para la salud en el huésped. Sin embargo, el metabolismo microbiano también puede causar que se formen otras sustancias con actividad biológica dañina para la salud, como es el caso de las AB (Pachlová *et al.*, 2018).

2.2 Consumo de alimentos fermentados

Los productos fermentados se han vuelto un foco de atención para el sector de la alimentación. Y aunque los alimentos fermentados no son nuevos, sino que han estado en nuestra gastronomía desde hace siglos, son ahora mismo una tendencia muy relevante por diversas razones (Diario de gastronomía, 2018).

Desde el punto de vista del sector de la alimentación, el mercado está viendo un crecimiento, tanto en la venta de alimentos y bebidas fermentados, como en el lanzamiento de nuevos productos. En 2002 se lanzaron al mercado 100 productos a nivel mundial, en 2016 se presentaron 1800 y en 2017 representaron casi 2% de los nuevos productos a nivel global (Diario de Gastronomía, 2018).

Desde que la industria de alimentos detectó el potencial de estos alimentos y bebidas por sus beneficios para la salud, entre ellos la mejora de la microbiota intestinal, grandes compañías internacionales de alimentación y dedicadas a la

investigación de enfermedades están invirtiendo en el desarrollo de estos productos. Las grandes multinacionales son conscientes de las posibilidades alrededor de los fermentados y los probióticos y ya están apostando por este tipo de productos en otros mercados. Empresas como Red Bull, Coca Cola o General Mills trabajan, por ejemplo, con verduras o bebidas fermentadas en aquellos países en los que estos productos son parte de la cultura o la gastronomía local ya que esto les facilita la introducción de nuevas marcas de bebidas tradicionales (Diario de Gastronomía, 2018).

2.2.1 La cerveza

La cerveza goza en nuestra sociedad de una reconocida estima dentro de la dieta. A nivel mundial nuestro país se encuentra en el sexto lugar de consumo y en el segundo de Latinoamérica. Esto se debe a que en promedio los mexicanos consumen 6.1 L de cerveza al mes, sin contar diciembre, mes en el que se consumen cerca de 7.9 litros. Actualmente, cada mexicano bebe 65 litros de cerveza anuales, ocho más que los 57 que se consumían hace cinco años, según datos de Cerveceros de México (Celis, 2018).

Más de 69% de los hogares mexicanos consume cerveza. La ciudad que más toma cerveza en México es Monterrey y representa 16% de todo el consumo nacional. En promedio, los regiomontanos toman alrededor de 72 litros per capita, lo que equivale a 203 botellas de 355 mililitros. De hecho, en Monterrey se consumen 10 cajas de cerveza per capita, superando a ciudades como Cancún, Guadalajara y la Ciudad de México, en donde se consumen cerca de nueve cajas (Celis, 2018).

Por otra parte, la cerveza mexicana llega a 180 países, principalmente a Estados Unidos. Por lo cual México es el principal exportador de esta bebida en el mundo, con 21% de los envíos a nivel internacional, seguido por Holanda con 14.4%, Bélgica, que ostenta 11%, y Alemania tiene un 9.9% (Celis, 2018). Datos del

gremio cervecero establecen que la elaboración de cerveza, de acuerdo con la producción bruta, está dentro de las 14 actividades más importantes de la producción manufacturera del país de las 291 clases que hay, después de la refinación del petróleo y fabricación de automóviles y camionetas, ocupando así, la industria cervecera el tercer lugar en la producción manufacturera del país (Celis, 2018).

Debido a la popularidad de las cervezas de producción industrial, la cerveza artesanal rescata estilos clásicos del producto que eran poco conocidos en México, debido a la popularidad de las cervezas de producción industrial, por ello, surge la cerveza elaborada de forma artesanal para satisfacer la demanda de consumidores más exigentes (ACERMEX, 2019).

En México, la cerveza artesanal se empieza a elaborar alrededor de 1994, sin embargo, en a partir de los últimos cinco años su popularidad ha crecido de manera exponencial por todo el país aun cuando no existe un marco regulatorio que defina y proteja esta categoría. La producción anual de cerveza artesanal no excede 1% del mercado cervecero nacional, ya que su producción a gran escala no es rentable para las grandes empresas cerveceras debido a que su costo de producción es más elevado, y aún no existe un mercado masivo para estos estilos (ACERMEX, 2019).

2.2.2 El vino tinto

Aunque el vino todavía no forma parte de la dieta cotidiana de las familias mexicanas, poco a poco se incrementa su consumo en el país; creciendo alrededor de 8% anual, impulsado principalmente por los jóvenes profesionistas y las mujeres. El consumo anual *per capita* se ha incrementado de manera constante. En 2002 el consumo era de 250 mL; en 2009 fueron 450; en 2013, 750, y en abril de 2018 llegó a 964 mL, es decir, casi un litro, pero aún es bajo en comparación con Europa (45 L per capita), con países como Chile y Argentina (25 L) y en la región del TLCAN (15 litros) (Gómez, 2018).

México ocupa el 31^o lugar en producción de uva a nivel mundial, destinando alrededor de 32,000 ha a este cultivo y cerca de 24 % se destinan a producir vino generando alrededor de 20 millones de litros al año (Ortiz de Zarate, 2017). Se ha observado que el mercado del vino en México se encuentra en crecimiento, tanto en producción nacional como en consumo, se reporta que en 2016 se alcanzó una producción de 18.9 millones de hectolitros. Adicionalmente, este mismo año el vino nacional superó por primera vez al vino español en consumo interno al alcanzar 33.9 % de las ventas, contribuyendo con 29.2 % del valor total del mercado, seguido de España con 22.7 % y Chile con 12.8 % (El Financiero, 2017). Por su parte, en México el consumo *per capita* anual ha aumentado hasta alcanzar 750 mL, y se espera que continúe creciendo a una tasa sostenible de 10 a 12 % para los próximos años (Ortiz de Zarate, 2017).

En esta actividad destacan los estados de Baja California, Zacatecas, Coahuila y Querétaro, este último produciendo anualmente alrededor 27 mil toneladas de uva y 3 millones de botellas de vino (El Financiero, 2017).

En el país se distinguen tres regiones vitivinícolas (Ortiz de Zarate, 2017):

- Zona norte. De los vinos elaborados en México, 83 % son producidos en esta zona, considerada la más importante del país y ésta comprende los estados de Baja California y Sonora. Es conocida como la franja del vino y sus características climáticas permiten obtener cosechas de máxima calidad.
- Zona Comarca Lagunera. Abarca 4 % de la producción vinícola del país y comprende los estados de Coahuila y Durango
- Zona Centro. Incluye los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro y Zacatecas, abarcando 13 % de la producción nacional.

Actualmente el estado de Querétaro cuenta con aproximadamente 25 casas vinícolas por lo cual se ha convertido en la zona vitivinícola más importante en la región Centro-Bajío y se ubica en el segundo lugar nacional de producción de vinos, sólo por debajo de Baja California. La ruta vinícola se conforma en gran parte de demarcaciones del semidesierto queretano e integra a Ezequiel Montes, El Marqués, Amealco de Bonfil, Tequisquiapan, San Juan del Río, Pedro Escobedo,

Colón, Cadereyta de Montes y Toluca (Estrella, 2018). La actividad vitivinícola de Querétaro crece a un ritmo de 15 a 20 % anual y no ha podido tener un mejor desempeño debido a que no hay suficiente producción mundial de vides para atender la demanda.

2.2.3 El queso

El queso es un elemento importante de la cocina mexicana, alcanza un consumo *per capita* en nuestro país es de 6 kg al año y tiene muchas posibilidades de crecimiento, pues esta industria tiene espacios para su incremento hasta alcanzar a los países con consumo de hasta 15 kg *per capita*.

De acuerdo con la Cámara Nacional de la Industria Lechera, los productos lácteos fermentados de mayor crecimiento en México son: el yogurt, con tasas de 6 a 7% y los quesos con aumentos de 3% en su volumen por año. Sin embargo, uno de los principales retos de esta industria, es que la producción nacional (con cerca de 38 tipos de queso) solo cubre 75% de la demanda interna del país; esto debido a que la mayoría de sus fabricantes son pequeñas y medianas empresas, quienes presentan problemas para el abasto de la materia prima, poca o nula tecnología y bajos controles de calidad (Chacón, 2013).

En México, los productos lácteos como los quesos y los yogurts, así como las leches industrializadas (pasteurizada, ultrapasteurizada y en polvo), ocupan los primeros lugares de comercialización, manifestando una tendencia hacia el abastecimiento de las zonas urbanas, ya que estas zonas poseen vías de comunicación accesibles y concentran grupos con niveles de ingreso más altos, en contraste con las zonas no urbanas, donde el consumo de lácteos se limita principalmente a leche bronca y productos artesanales (CANILAC, 2019).

2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)

2.3.1 Características

Las BAL son los principales microorganismos con actividad descarboxilasa por lo cual son productoras de aminas biogénicas. Las BAL se caracterizan por ser

Gram-positivas, catalasa negativa, y anaerobio-facultativas. Utilizando diversos medios y variando las condiciones de incubación es posible realizar un aislamiento dirigido de BAL, en que los géneros más importantes son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*.

2.3.2 Identificación e aislamiento

La identificación fenotípica de las cepas BAL aisladas, se puede realizar mediante el estudio del metabolismo de hidratos de carbono para la identificación del género, cómo es el caso de las galerías API, las cuales son un método moderno empleado para la realización de pruebas bioquímicas de forma rápida, donde los cambios observables constituyen el perfil bioquímico (Ramírez *et al.*, 2016).

Todavía no hay medios suficientemente selectivos para que permitan el aislamiento y diferenciación de BAL, y especialmente de las nuevas especies; ésta es la razón por la que se han desarrollado herramientas moleculares, además del tiempo que generalmente se tarda en realizar pruebas fenotípicas y fisiológicas, para identificar rápidamente estas bacterias en alimentos fermentados. Entre esas herramientas moleculares, la PCR múltiple constituye un método bastante barato y rápido para la identificación de BAL. Por ejemplo, se diseñó una PCR múltiple para permitir la identificación de siete especies de especies probióticas de *Lactobacillus*. La PCR múltiple también se ha diseñado para la identificación de BAL en alimentos fermentados como la masa fermentada, vino, café, frutas de banano, encurtidos y productos lácteos (Cousin *et al.*, 2019). De Pasquale *et al.* (2018) proponen el uso de reacción en cadena de polimerasa-ADN polimórfica amplificada al azar (RAPD-PCR), para identificar el genotipo de las BAL de interés.

2.4 Aminas biogénicas

2.3.1 Generalidades

Las aminas biogénicas (AB) son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular conocidas por sus efectos fisiológicos. Algunas AB actúan como

hormonas, pero muchas otras se consideran neurotransmisores o precursores para la síntesis de hormonas, alcaloides u otros metabolitos.

Atendiendo a su estructura química, las AB se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) y en función del número de grupos aminos de la molécula, en monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina) (Figura 1) (Galvano *et al.*, 2009).

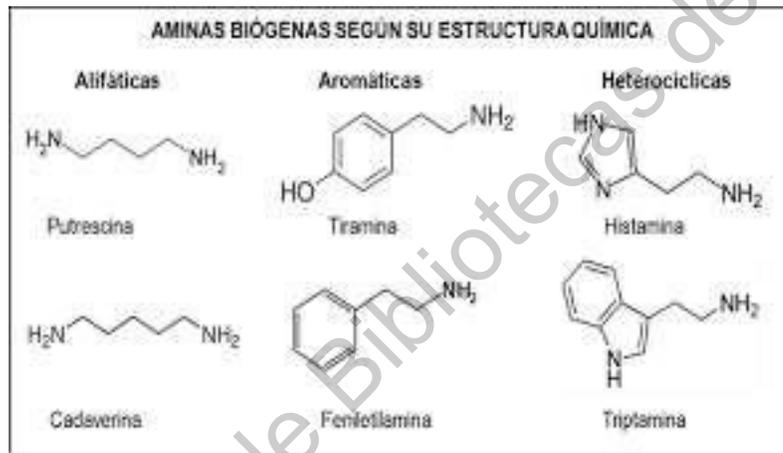


Figura 1. Clasificación de aminas biogénicas de acuerdo a su estructura química.

(Navarro *et al.*, 2017)

Las AB son indeseables en todos los alimentos y bebidas porque, si se consumen en una concentración suficientemente alta, pueden inducir intoxicaciones alimentarias. Además, la determinación de AB en los alimentos en general, y en los productos cárnicos en particular, tiene un doble interés, por un lado, por su efecto toxicológico y, por otro, por la posibilidad de ser empleadas como índices de calidad (Landete *et al.*, 2007).

2.3.2 Biosíntesis de AB

Más comúnmente las AB propiamente dichas se forman por descarboxilación enzimática de los aminoácidos libres por acción de las enzimas aminoácido descarboxilasas de origen microbiano principalmente (Figura 2). La actividad descarboxilasa puede generarse en los alimentos de forma espontánea o puede ser producida en el alimento por microorganismos como las BAL (Ekici *et al.*, 2018).

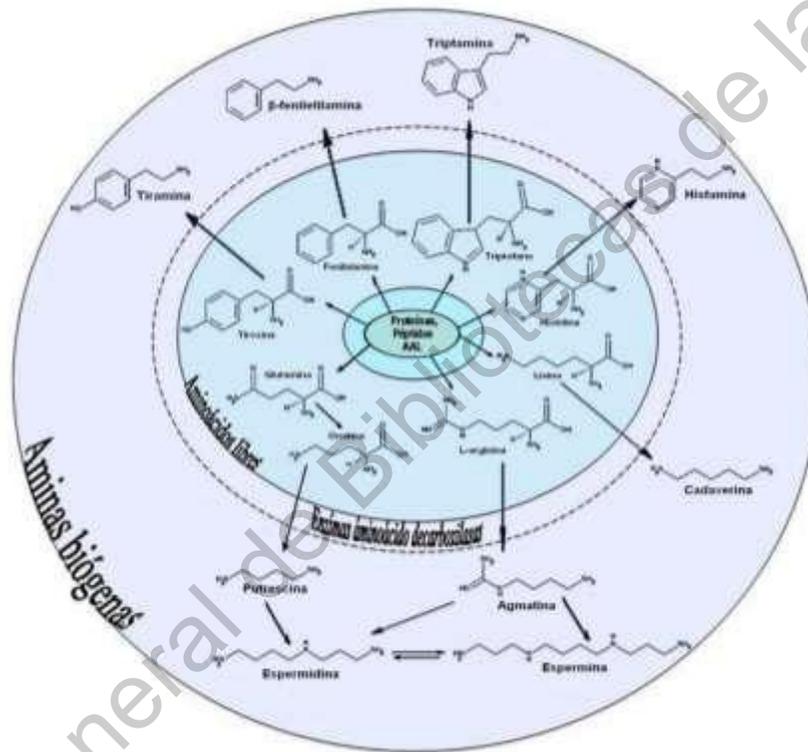


Figura 2. Formación de aminas biogénicas a partir de aminoácidos libres.

(Triki, 2013).

Para que las AB se generen en el alimento se requiere la presencia simultánea de tres factores: presencia de microorganismos con actividades aminoácido descarboxilasa, disponibilidad de sustrato y condiciones ambientales (temperatura, pH, salinidad, existencia de cofactores o de enzimas catabólicas) adecuadas (Karovičova *et al.*, 2003).

- **Microorganismos con actividades aminoácido descarboxilasa:** La presencia de microorganismos con la capacidad de descarboxilar aminoácidos es fundamental para la formación de AB en los alimentos. Esta característica ha sido descrita en diferentes géneros, especies y cepas bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativas. Considerándose los principales responsables de la formación de AB en pescados (Linares *et al.*, 2011).
- **Disponibilidad de sustrato:** Para la síntesis de AB es necesaria la presencia de aminoácidos que actúen como sustrato inicial, a partir de los cuales se generaran las AB. Mientras se lleva a cabo el proceso de fermentación, la proteólisis permite la liberación de los aminoácidos, aumentando así la concentración de sustratos. Es por ello que se detecta una mayor concentración de AB en productos con largos periodos de maduración comparados con productos frescos (Linares *et al.*, 2011).
- **Condiciones ambientales:** Algunos autores mencionan la relación entre las condiciones de elaboración de los alimentos y la biogénesis de AB, denotando la importancia del control del proceso de elaboración para disminuir en lo posible la concentración de AB en el producto final.

Los factores más importantes para considerar son: pH ácido, pues la mayoría de las enzimas descarboxilasas poseen un pH óptimo en torno a pH 5.0 (Moreno *et al.* 2001). Además, en algunas ocasiones el pH ácido propicia la transcripción de los genes que codificantes para dichas enzimas. Particularmente en los alimentos fermentados el proceso de fermentación propicia un descenso del pH que proporciona las condiciones óptimas para la síntesis y actividad de la descarboxilasa.

Por otro lado, el aumento de la concentración de sales y carbohidratos afecta a la actividad del agua, disminuyendo el crecimiento de los microorganismos productores de AB y por tanto la concentración final de las mismas (Ruiz *et al.*, 2004).

Otro factor para considerar es la temperatura de almacenamiento del producto fermentado, ya que su incremento favorece el crecimiento de los microorganismos

productores y con ello la producción de AB. Una disminución de la concentración final de AB en quesos y vinos debido a la disminución de la temperatura, ha sido descrita por Ferrer *et al.* (2007). Parece, por tanto, un parámetro muy útil para prevenir la acumulación final de estos compuestos.

La concentración de etanol es otro factor ambiental de suma importancia ya que se ha encontrado relación inversa entre la concentración de etanol y la capacidad de los microorganismos para sintetizar AB (Arena *et al.*, 2008).

Por último, la presencia de determinados cofactores puede también afectar también a la síntesis de AB ya que gran parte de las enzimas descarboxilasas estudiadas hasta el momento son piridoxal-5'-fosfato (PLP) dependientes. Si bien, existe un amplio debate entre diversos autores sobre la influencia del tiempo y temperatura de almacenamiento de los alimentos y la acumulación de AB en los mismos. De modo general se puede afirmar que un aumento del tiempo y la temperatura de almacenamiento aumenta la concentración de AB en el producto final (Linares *et al.*, 2012).

2.3.3 Efectos nocivos en el humano

Niveles comunes de AB en alimentos y bebidas no representan un riesgo grave para los consumidores saludables, pues se debe tener en cuenta que, en circunstancias normales, el organismo humano dispone de sistemas de desintoxicación de estas AB principalmente a nivel intestinal debido a la acción de la monoamino oxidasa (MAO; CE 1.4.3.4), diamina oxidasa (DAO; CE 1.4.3.6) y poliamina oxidasa (PAO; CE 1.5.3.11) las cuales están involucradas en el metabolismo de la histamina y pueden ser inhibidos por putrescina o cadaverina, lo que explicaría que la histamina presente en los alimentos indique un umbral de toxicidad menor con respecto a la histamina pura. De este modo, ciertas AB actuarían como potenciadores de la toxicidad de la histamina, al inhibir la conversión de histamina en otros metabolitos menos tóxicos (Figura 3).

Por lo tanto, la toxicidad de estas AB depende de la eficiencia del sistema de desintoxicación que puede verse alterado por diferentes factores o circunstancias, entre ellos el consumo de IMAO/IDAO (inhibidores de monoamino oxidasa y de la diamina oxidasa), alcohol, deficiencia del sistema inmune, enfermedades gastrointestinales, etc. La alteración de este sistema expone al individuo a un alto riesgo de toxicidad en presencia de las AB. De hecho, escasa cantidad de tiramina podría provocar fuertes migrañas, con hemorragia intracraneal en pacientes tratados con IMAO clásicos, mientras que una ingesta de tiramina entre 50 y 150 mg es más tolerada por pacientes tratados con una nueva generación de IMAO, los denominados RIMA (inhibidor reversible de MAO-A) (Triki, 2013).

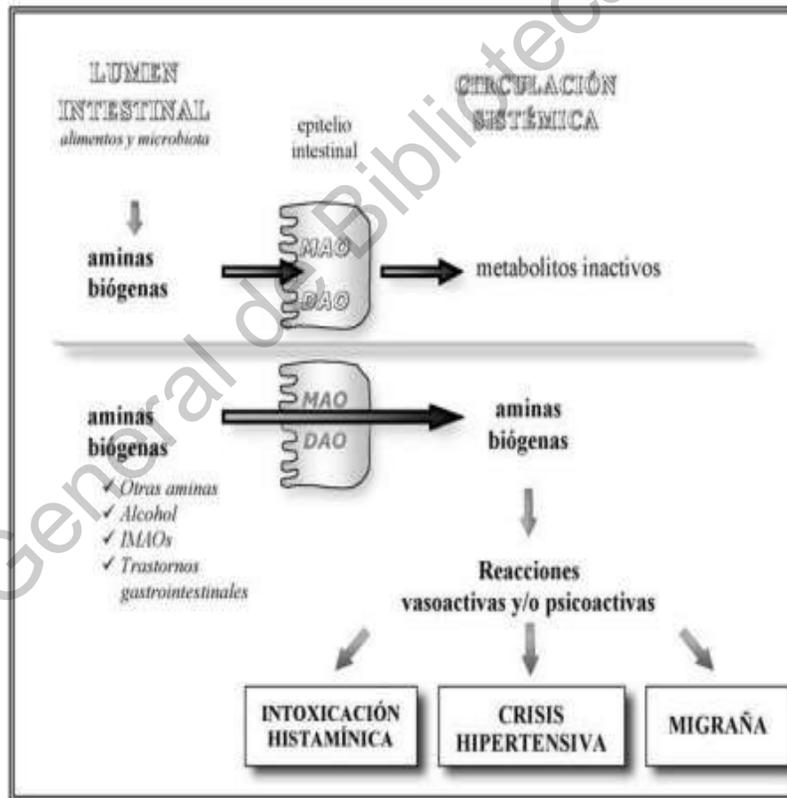


Figura 3. Mecanismo de acción de AB en el humano.

(Triki, 2013).

El consumo de alimentos con altas concentraciones de AB ha sido relacionado con problemas toxicológicos en los consumidores. La tiramina y la

histamina son las AB que presentan un mayor potencial tóxico, aunque cabe mencionar que existen otros tipos de AB y cada una de ellas presenta efectos fisiológicos y toxicológicos distintos como se menciona en la Tabla 1 (Triki, 2013).

El conocimiento de los niveles de histamina en los alimentos es necesario para evaluar el riesgo a la salud que representa el consumo de ciertos productos y se puede utilizar como indicadores para los marcadores de calidad de los alimentos. Incluso algunas AB son investigadas como un posible precursor mutagénico, ya que algunas aminos pueden ser nitrosadas al reaccionar con nitrito, lo cual produce nitrosaminas que son carcinógenas y representan una amenaza potencial para la salud de los humanos (Ekici *et al.*, 2018).

Tabla 1. Efecto fisiológico y toxicológico de las AB.
(Triki, 2013).

| Aminas biogénicas | Efectos fisiológicos | Efectos toxicológicos |
|-------------------|---|---|
| Tiramina | Neurotransmisor, favorece vasoconstricción periférica; aumenta presión arterial, respiración y la glucemia; libera la norepinefrina; interviene en la formación de nitrosaminas. | Dolor de cabeza, la migraña, desorden neurológico y náuseas, hipertensión, vómito, parálisis de las extremidades, taquicardia, hemorragia cerebral y arterial. |
| Histamina | Neurotransmisor; psicoactiva; hormona local; interviene en crecimiento diferenciación celular, ritmo cardíaco, regulación de temperatura corporal, ingesta de alimentos, respuesta inmune, respuesta alérgica, síntesis de noradrenalina y adrenalina; participa en procesos inflamatorios, de cicatrización, | Dolor de cabeza, migraña, hipertensión, taquicardia, anafilaxia, edemas, sudoración, obstrucción nasal, la broncoconstricción, espasmo, urticaria, diarrea, mareos, vómitos, trastornos de aprendizaje y memoria, la presión arterial y de la neurotransmisión. |

| | |
|------------|---|
| | circulación, tiene efecto vasodilatador. |
| Putrescina | Neurotransmisor; Taquicardia, psicoactiva, regula la hipertensión, efectos expresión genética, carcinogénicos, rigidez interviene en la absorción mandibular, bradicardia, intestinal, el crecimiento y potencia efecto de otras diferenciación celular, aminas biogénicas, formación de provoca trastornos de nitrosamina, disminuye la neurotransmisión. presión arterial y el catabolismo de histamina y tiramina. |
| Cadaverina | |

Como puede observarse, las AB son causantes de diversas afecciones a la salud, sin embargo, los casos por intoxicación son reportados ocasionalmente. La histamina es la única AB que se encuentra con estadísticas de reporte dentro del Sistema Nacional de Informes de Brotes de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (EE.UU); los brotes reportados asociados a ésta AB fueron 44 en el periodo de 1997 a 2017 (Tabla 2)(Figura 4). Los brotes asociados a esta AB, se ven favorecidos en los meses calurosos como puede observarse en la Figura 5, esto debido a que las AB también están fuertemente relacionadas con el deterioro y el calor acelera el proceso de deterioro en los alimentos.

Tabla 2 Numero de reportes asociados al consumo de histamina en el periodo 2008-2018 (CDC, 2020).

| Reporte | Casos |
|-------------------|-------|
| Brotos | 163 |
| Enfermos | 499 |
| Hospitalizaciones | 4 |
| Muertos | 0 |

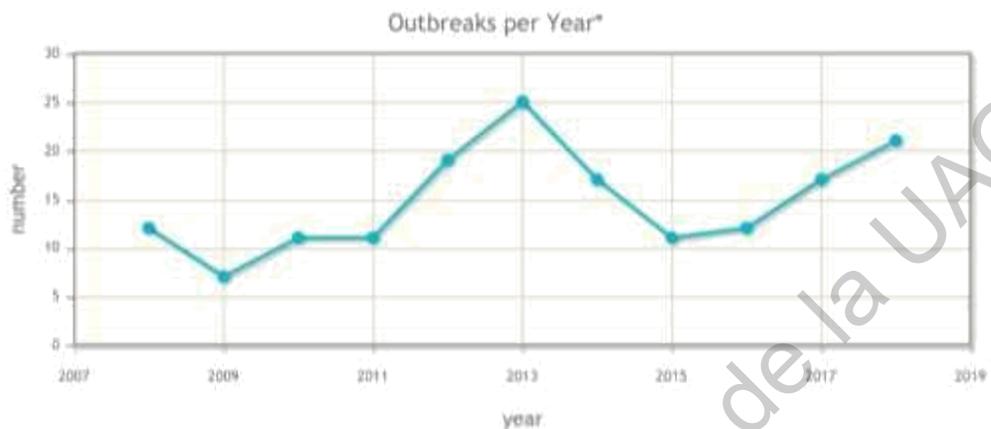


Figura 4. Evolución del número de brotes anuales por histamina en EE.UU. (CDC, 2020)

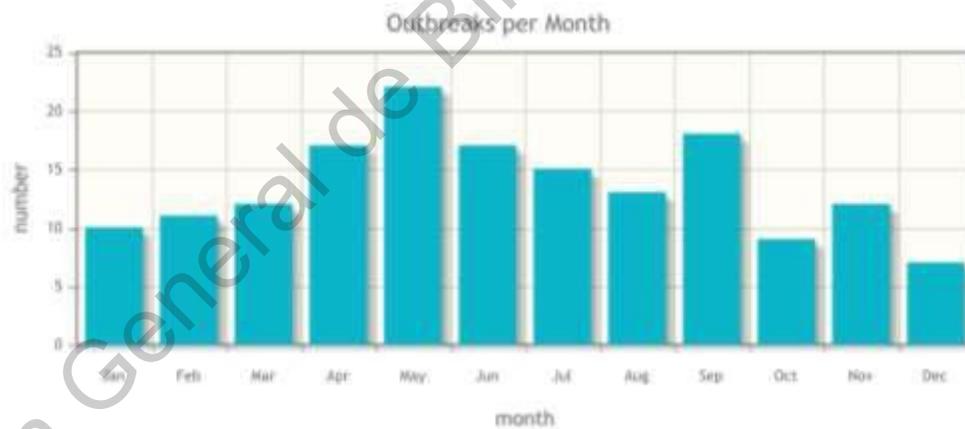


Figura 5. Número de brotes mensuales por histamina en EE.UU. (CDC, 2020)

2.4 Presencia de AB en alimentos

La mayoría de los productos fermentados por BAL contienen trazas de histamina (Buñková *et al.*, 2013). Se ha reportado que las BAL son capaces de producir histamina, tiramina y feniletilamina, pero no triptamina, cadaverina y

putrescina (Landete *et al.*, 2007). Landete *et al.* (2007) reportaron que *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus mali* y *Leuconostoc mesenteroides* sólo podían producir histamina, *Lact. brevis* puede producir tiramina y feniletilamina, *O. oeni* puede producir histamina y putrescina, mientras que *Lact. hilgardii* fue capaz de producir histamina, tiramina, feniletilamina y putrescina. Por otro lado, Ekici *et al.* (2018), encontraron que *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, se identifican como microorganismos capaces de producir histamina.

La determinación del umbral de toxicidad exacto de las AB en individuos es extremadamente difícil de determinar, ya que la dosis tóxica depende en gran medida de la eficacia de los mecanismos de detoxificación de cada individuo entre otros factores. Aunque la toxicidad de las AB es un tema controvertido, la ingestión de histamina de entre 70 y 1000 mg generalmente causará síntomas clínicos de intoxicación. Por ello, la FDA ha establecido una concentración de acción de riesgo para histamina en atún de 50 mg de histamina / 100 g. Además, debe señalarse que cantidades más pequeñas de AB pueden causar envenenamiento, especialmente si la persona es vulnerable, debido a la inhibición del mecanismo de desintoxicación de AB en el cuerpo debido a razones tales como desordenes metabólicos, enfermedades gastrointestinales, ingesta de medicamentos, alcohol, y la existencia de otras aminas (Ekici *et al.*, 2018).

Como ya se mencionó con anterioridad, la gama de productos alimenticios fermentados es amplia tal como se muestra en la Figura 6, sin embargo, se ha observado que la presencia de aminas es más recurrente en aquellos fermentados que sufren un proceso de maduración, como lo son los quesos, cerveza y el vino (McCabe-Sellers *et al.*, 2006).

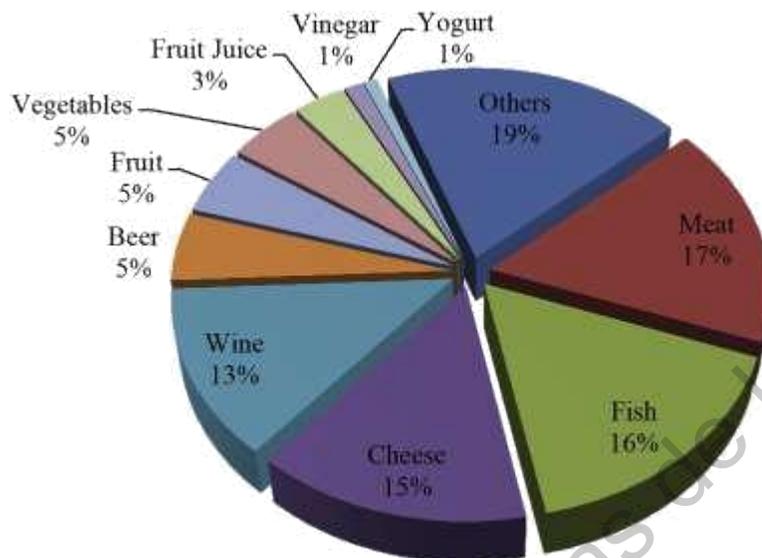


Figura 6. Desglose porcentual de las investigaciones con aminas biogénicas relacionadas con productos alimenticios publicadas 2010-2016.

(Ordóñez et al., 2016)

2.4.1 AB en Cerveza

La cerveza es uno de los alimentos más seguros desde el punto de vista microbiológico, debido a la presencia de etanol (0.5 a 10% p/p), de compuestos amargos de lúpulo (aproximadamente 17 a 55 ppm de iso- α -ácidos), dióxido de carbono (aproximadamente 0.5% p/p), el pH bajo (3.8–4.7), así como debido al contenido extremadamente reducido de oxígeno (<0.1 ppm) y la presencia de trazas de sustancias nutritivas como la glucosa, maltosa y maltotriosa. Sin embargo, algunas bacterias pueden proliferar durante el procesamiento y almacenamiento del producto, causando la aparición de defectos organolépticos y compuestos indeseables, como las AB (Poveda, 2019).

La cerveza ha sido considerada como riesgosa para algunos consumidores debido a la presencia de AB. La alta ingesta de AB no se produce por el alto contenido de estas en cervezas individuales, sino por el alto consumo que se puede obtener en un corto período de tiempo de la bebida. Además, los efectos adversos de las aminas pueden ser intensificados por el alcohol, ya que la actividad de la

monoaminoxidasa puede ser suprimida por el etanol, inhibiendo así la eliminación de AB a nivel intestinal y aumentando su toxicidad. Las AB más abundantes en cerveza son la histamina, cadaverina, putrescina, 2-feniltilamina y tiramina. El origen de las AB en la cerveza puede provenir de dos vías: 1) pueden producirse por la acción de microorganismos positivos a la descarboxilasa, como las aminas histamina, tiramina y cadaverina; 2) AB se pueden encontrar naturalmente en materias primas (mosto, malta, lúpulo), como es el caso de la espermidina, 2-feniletilamina y espermina. La putrescina puede tener ambos orígenes (Poveda, 2019).

2.4.2 AB en queso

El queso es el principal producto lácteo fermentado que puede contener niveles potencialmente dañinos de AB, específicamente tiramina, histamina y putrescina (Şanlı y Şenel, 2005). Los quesos se encuentran entre los alimentos que contienen altas actividades enzimáticas y microbianas que causan la formación de AB a partir de la descarboxilación de aminoácidos. El empleo de leche cruda, el incumplimiento a las cumplir con prácticas sanitarias durante la producción y el amplio periodo de maduración que varía en función del tipo de queso madurado son factores que pueden propiciar la formación de AB en el queso (Şanlı y Şenel, 2005).

Usualmente la microflora empleada en quesos madurados puede provenir de cultivos iniciadores y cultivos secundarios, donde ambos contienen BAL, las cuales pueden sobrevivir a la pasteurización y propagarse en los productos lácteos durante el almacenamiento. En general, se puede decir que los microorganismos presentes en el producto juegan un papel importante en el proceso de maduración, ya sea directamente a través de su actividad metabólica, o indirectamente a través de enzimas liberadas en la matriz del queso después de la descomposición celular (Pachlová *et al.*, 2018).

Sin embargo, algunas cepas pueden liberar compuestos que pueden resultar tóxicos para el consumidor, como es el caso de las AB. Durante el proceso de

maduración del queso, hay una descomposición de caseínas, lo que conduce a una acumulación de aminoácidos libres que se pueden transformar en AB por la actividad de descarboxilasas presentes en la microbiota (Renes *et al.*, 2014).

2.4.3 AB en los vinos

Las principales AB reportadas en vinos son putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermina y espermidina. Estas AB provienen de dos fuentes principales, las uvas (consideradas naturales) y el proceso de [vinificación](#) (asociado con la actividad microbiana) (Henríquez, 2018). Las principales AB encontradas en uvas son espermina, espermidina y putrescina y las asociadas con la actividad microbiana son histamina, cadaverina, tiramina y feniletilamina, que se producen principalmente por descarboxilación de aminoácidos libres (FAA) durante las fermentaciones alcohólicas (FA) y malolácticas (FML). Incluso cuando se producen AB en ambos procesos, el nivel más alto se forma durante la FML como resultado de la actividad enzimática de las BAL. Por ello es necesario identificar las principales fuentes o etapas de la formación / contribución de AB durante la vinificación. Al establecer la dinámica de AB, será posible llevar a cabo intervenciones correctivas para reducir o prevenir su presencia, desarrollando o modificando algunas prácticas enológicas y / o tecnológicas. Para determinar el efecto de la materia prima y cada paso de vinificación (FA, FML y vino) es necesario evaluar el contenido de AB y los precursores de FAA durante todo el proceso de vinificación. Al comienzo de la vinificación, el contenido de la FAA muestra una gran variabilidad porque depende de varios factores, como la variedad y madurez de la uva y el tipo de suelo. Luego, a lo largo del proceso, la FAA muestra niveles variables debido a tres razones principales: i) son la principal fuente de nitrógeno asimilable a las levaduras, ii) la actividad de las levaduras podría aumentar el contenido de FAA a través de la degradación enzimática de proteínas y iii) la formación de aminas biogénicas de FAA a través de la descarboxilación enzimática disminuye su contenido (Henríquez, 2018).

2.6 Detección de BAL productoras de AB

Es importante mencionar que no todas las cepas de BAL son productoras de AB, pues aun conociendo el género y la especie, no se puede asegurar que una cepa es capaz de producir AB. Con base en la importancia de las BAL en la producción y en la calidad de los alimentos fermentados, una identificación rápida de estos microorganismos es de interés práctico. Se han desarrollado varios métodos con base en las propiedades fenotípicas y fisiológicas, sin embargo, a menudo son insuficientes para una identificación precisa en el nivel de las especies y, por lo tanto, en mayor medida se requiere la aplicación de métodos de biología molecular (Petri *et al.*, 2013).

Elsanhoty *et al.* (2016) realizaron la detección de BAL portadoras de genes responsables de producción de AB mediante la técnica molecular de PCR. La PCR se realizó con cebadores específicos de los genes correspondientes a cada una de las descarboxilasas involucradas en la producción de AB. En esta prueba Elsanhoty *et al.* (2016) reportan que las principales AB producidas por las especies de BAL son histamina a través de HDC, tiramina a través de tirosina descarboxilasa (TDC) putrescina vía ornitina descarboxilasa (ODC).

2.7 Determinación de AB

Los métodos analíticos para la determinación de AB en varias matrices se basan en cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa (HPLC), cromatografía con UV o detección de fluorescencia después de la derivación previa o posterior a la columna (Moracanin *et al.*, 2015).

Recientemente la cromatografía de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) también se ha empleado en el análisis de AB recientemente, aunque la disponibilidad de tal instrumentación es aún bastante limitada y el costo de dicho análisis es relativamente alto, especialmente para la detección de grandes

cantidades de muestras. Sin embargo, la alta selectividad y sensibilidad de LC-MS/MS hace que esta técnica sea más que adecuada para análisis de múltiples AB en diversas matrices (Moracanin *et al.*, 2015).

2.8 Prevención de la formación de AB en alimentos

Usualmente las AB en los alimentos han sido catalogadas como riesgo potencial para la salud humana debido a poseer actividad vasoactiva. Sin embargo, hoy en día se estudian como indicadores de higiene, principalmente histamina, tiramina, cadaverina y putrescina, ya que los requisitos de inocuidad son mayores (Latorre *et al.*, 2010). Para poder ejercer control en la formación de estos compuestos, es importante realizar un análisis sobre la presencia de BAL en los procesos productivos y el desarrollo de estas bacterias productoras de AB. De aquí la importancia de las AB en la calidad sanitaria de la materia prima y los ingredientes, así como de la sanidad eficiente y oportuna de los equipos de procesamiento, con lo cual se puede prevenir la contaminación y proliferación bacterias con capacidad de producir AB y, a su vez, es posible reducir el contenido de aminas biogénicas en los alimentos (Marques *et al.*, 2008).

Se han estudiado diversas estrategias para lograr un control de BAL en equipos, utensilios y superficies para evitar que dicha contaminación llegue a los alimentos; dentro de estas estrategias se incluyen tratamientos físicos y químicos. Sin embargo, la utilización indiscriminada de agentes germicidas ha provocado que los microorganismos contaminantes generen adaptación y eventual resistencia a estos. De acuerdo con esta concepción, es necesario evaluar la susceptibilidad de estos microorganismos a los agentes germicidas empleados para su control. Con la finalidad de proveer de opciones de rotación de germicidas, con aceptable eficiencia sobre el control de la flora particular instalada en la planta alimenticia (CFSAN/FDA, 2001).

2.8.1 Desinfección química

2.8.1.1 Germicidas convencionales

La aplicación de germicidas como el cloro, agua electrolizada, ácido peracético y láctico, son medidas viables para el control y eliminación de microorganismo en superficies inanimadas en el interior de una empresa (CFSAN/ FDA, 2001).

Se ha observado que diversas bacterias con alto nivel de patogenicidad humana, han sido altamente asiladas en hospitales y en los últimos 50 años, se ha incrementado su capacidad de resistencia, efecto atribuido al uso incrementado de productos de limpieza a base de desinfectantes. Este problema, mejor conocido como resistencia, puede estar mediado por diversas vías entre las cuales se encuentran: transposones, transformación, bacteriófagos o por bombas de excreción, permitiendo así a la bacteria reconocer y expulsar diferentes antibióticos y sustancias antibacterianas, lo cual genera resistencia. Además de esto, las condiciones ambientales aptas, y los mismos abruptos cambios ambientales ha conllevado a que estos patógenos puedan desarrollar mecanismos de resistencia (Pardo, 2014).

2.8.1.2 Germicidas alternativos

Por ello se han investigado alternativas al tratamiento tradicional, con la finalidad de generar rotación de químicos y reducir en los microorganismos la resistencia a agentes germicidas. Estudios recientes han reportado que el agua electrolizada (EW) es un sustituto potencial para el tratamiento tradicional con cloro. EW es una solución generada al mezclar un electrolito que contiene cloro, cloruro de sodio (NaCl) y / o ácido clorhídrico (HCl), con agua del grifo a través de una celda electrolítica. Cuando una celda de electrólisis no contiene una membrana entre el ánodo y el cátodo, resulta en agua electrolizada ligeramente ácida (SAEW) con un pH de 5.0-6.5 y una alta concentración de ácido hipocloroso (HOCl). SAEW puede

disminuir el daño ambiental y el impacto corrosivo en la industria alimentaria (Tango *et al.*, 2017).

El efecto bactericida del EW parece ser atribuido a su elevado potencial de oxidorreducción y a la existencia de iones activos, controlados y estables que le confieren un amplio espectro de actividad, que incluye bacterias, hongos y esporas (Nachón *et al.*, 2008). El mecanismo de acción sobre las bacterias se atribuye al efecto de oxidación sobre el enlace Y 1-4 de los lipopolisacáridos, sobre los grupos sulfhidrilo (-SH) y los aminoácidos de la pared bacteriana; de este modo se afecta al proceso de respiración y nutrición de los microorganismos, produciéndose oxidación de los componentes respiratorios, inhibición de la síntesis de proteínas, rotura de las cadenas de ARN y represión en la síntesis de moléculas del metabolismo celular, con disminución de la producción de ATP (adenosin trifosfato) (Kyanko *et al.*, 2010).

Por lo que respecta a las propiedades viricidas, el EW produce alteración de la cápside, ADNasas y ARNasas víricas. Debido a la concentración de iones y a su estabilidad química, el EW con pH neutro puede considerarse como no tóxica para las células eucarióticas, incluidas las del organismo humano (Kyanko *et al.*, 2010). La utilización del EW como desinfectante en la industria agroalimentaria está ampliamente documentada. Por otro lado, sus propiedades higienizantes y su carácter inocuo han hecho que empiece a considerarse su utilización directa en el ser humano, donde los estudios sobre los beneficios del agua electrolizada para la salud son cada vez más frecuentes. Sin embargo, en lo que respecta a la producción animal, el empleo de EW es una práctica relativamente reciente, por lo que todavía no abundan las referencias bibliográficas acerca de su uso en diversos ámbitos de la industria de alimentos (Taberner *et al.*, 2013).

Por otro lado, también se ha hecho uso del ácido peracético, el cual es un eficaz desinfectante que consiste en una combinación de peróxido de hidrógeno y ácido acético. El ácido peracético actúa de una manera similar a la de los clorógenos, es decir, con un amplio poder oxidante, pero, a diferencia de los primeros, su acción es mucho menos corrosiva, posee un mayor espectro de acción,

no mancha, resulta estable durante un largo tiempo y es efectivo en presencia de materia orgánica y de aguas duras. El ácido peracético no afecta al medio ambiente y se descompone en poco tiempo dejando como residuo agua, oxígeno y ácido acético. Además, por requerir bajas concentraciones el costo del ácido peracético es moderado (Kyanko *et al.*, 2010)

Debido a que el ácido peracético tiene una buena capacidad antimicrobiana y a que sus productos de descomposición son totalmente biocompatibles porque no dejan residuos tóxicos, la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado su uso para la desinfección directa de frutas y hortalizas (FDA, 2019). Varios trabajos reportan su eficacia desinfectante frente a bacterias, tanto *in vitro* como sobre alimentos (Kyanko *et al.*, 2010).

Existen múltiples estudios que demuestran la acción de diversos germicidas para el control de microorganismos patógenos como el estudio realizado por Pérez (2012) que analizó la resistencia de *Listeria monocytogenes* frente a 4 distintos germicidas y observó mayor resistencia frente al hipoclorito de sodio 1%; solamente para el ácido acético al 4% y 5 % el 100% de las cepas de prueba presentaron susceptibilidad, mientras que para los otros germicidas como el hipoclorito de sodio (1% y 2%) y el ácido láctico (1% y 2%) las cepas también mostraron sensibilidad intermedia y resistencia.

Sin embargo, a pesar de la fuerte evidencia de la acción de germicidas ante microorganismos patógenos, no hay estudios que evidencien el efecto que tienen ante el control de microorganismos deterioradores como las BAL.

II. JUSTIFICACIÓN

Recientemente el consumo de alimentos fermentados ha aumentado en México y a nivel mundial, principalmente debido a los beneficios que tienen sobre la salud. Adicionalmente, los alimentos fermentados se consideran como seguros debido a que su composición evitan la sobrevivencia y desarrollo de microorganismos patógenos.

Los beneficios a la salud que ofrecen este tipo de alimentos derivan de la presencia de microorganismos reconocidos como seguros (GRAS) que cumplen la función de probióticos y a muchos de los productos de su metabolismo que funcionan como prebióticos. Sin embargo, otros de los productos del metabolismo microbiano que causan afectación sobre la salud, como es el caso de las AB, pueden estar presentes en cantidades importantes. Las AB son sustancias nitrogenadas de bajo peso molecular, que se generan a partir de la descarboxilación de aminoácidos y, dependiendo del tipo de amina, dosis y del metabolismo del propio individuo que la consuma podrían generar enfermedad.

En México no existen reportes sobre daños causados por las AB, mientras que en EUA sólo existen reportes de brotes causados por histamina. Las características y proceso de elaboración de los alimentos fermentados podrían favorecer la producción de estas sustancias, en particular, en los productos artesanales que suelen ser elaborados bajo procesos no estandarizados y que emplean materia prima e ingredientes de calidad muy diversa. Por ello es importante identificar si los microorganismos presentes en alimentos fermentados poseen la capacidad de producir AB y evaluar los factores y condiciones que afectan su síntesis en el producto, así como la susceptibilidad de las cepas ante diversos germicidas que pueden ser empleados en la producción de alimentos fermentados.

IV. HIPÓTESIS

Los niveles de pH, concentración de alcohol y NaCl propios de los alimentos fermentados favorecen la producción de AB por parte de BAL. De igual forma, las BAL con capacidad de producción de AB son más resistentes a germicidas que aquellas cepas no productoras de AB.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la capacidad de BAL aisladas de productos fermentados para producir AB, la influencia de factores propios del alimento y su tolerancia ante germicidas de uso común en la industria

Objetivos específicos

1. Identificar la capacidad de producción de AB en cepas de BAL aisladas a partir de cerveza, vino y queso.
2. Evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento, el pH, la concentración de NaCl y alcohol sobre la producción de AB por parte de cepas de BAL.
3. Evaluar la sobrevivencia de cepas de BAL productoras de AB en la producción de cerveza artesanal.
4. Valorar la susceptibilidad de BAL ante germicidas comúnmente empleados en la industria.

V. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

5.1.0 Equipos

- Vortéx
- Cetrífuga METRIX® Velocity 14
- Homogeneizador Stomacher®
- Potenciometro HANNA® pH 211
- Incubadora INCUBATOR® 815
- Microscopio óptico
- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Termobloque Ependorf®
- Termociclador BioRad®
- Cámara electroforética BIORAD®
- Fotodocumentador UV
- VarioskanFlash® Cat.no. 5250040
- HPLC Agilent Technologies XDB-C8 LC
- Detector de fluorescencia (G1321A) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Stomacher®
- Synergy HT

5.1.1 Medios de cultivo

- Diluyente de peptona al 0.1% (DIBICO®)
- Caldo MRS (CMRS) (Caldo Man, Rogosa y Sharpe) (DIBICO®)
- Agar MRS (AMRS) (Agar Man, Rogosa y Sharpe) DIBICO®

5.1.2 Reactivos

- Peróxido de hidrogeno al 3%

- GoTaq™ Green Master Mix (Promega)
- Agua estéril
- Agua libre de nucleasas
- SybrSafe™ (Invitrogen)
- Agarosa
- Ácido tricloroacético al 5 % (p/v)
- Dietil-éter (Sigma Aldrich)
- Bicarbonato de sodio saturado
- Acetonitrilo para HPLC (Sigma Aldrich)

5.1.3 Material biológico

Como material biológico se emplearon cepas de cerveza y vino se aisladas en trabajos previos; también se incluyó una cepa comercial *Lactobacillus 30a* (ATCC 33222).

5.2 Métodos

5.2.1 Estrategia general del proyecto

Para la realización del presente trabajo se siguió la estrategia general que se muestra en la Figura 7. Primeramente, se realizó el aislamiento de BAL procedentes de queso madurado para posteriormente realizar una prueba de pureza en conjunto con las cepas de cerveza y vinos aisladas en previos trabajos, después, las BAL aisladas se sometieron a pruebas para determinar si contenían el gen de expresión de AB, donde, aquellas que resultaron positivas a alguno de los genes relacionados con la producción de AB fueron identificadas. Con los aislamientos identificados se determinó el efecto de factores intrínsecos del alimento que favorecen el crecimiento de las cepas y la producción de AB. Finalmente se evaluó la susceptibilidad de diversas especies de BAL al saneamiento con 3 distintos germicidas de uso común en la industria.

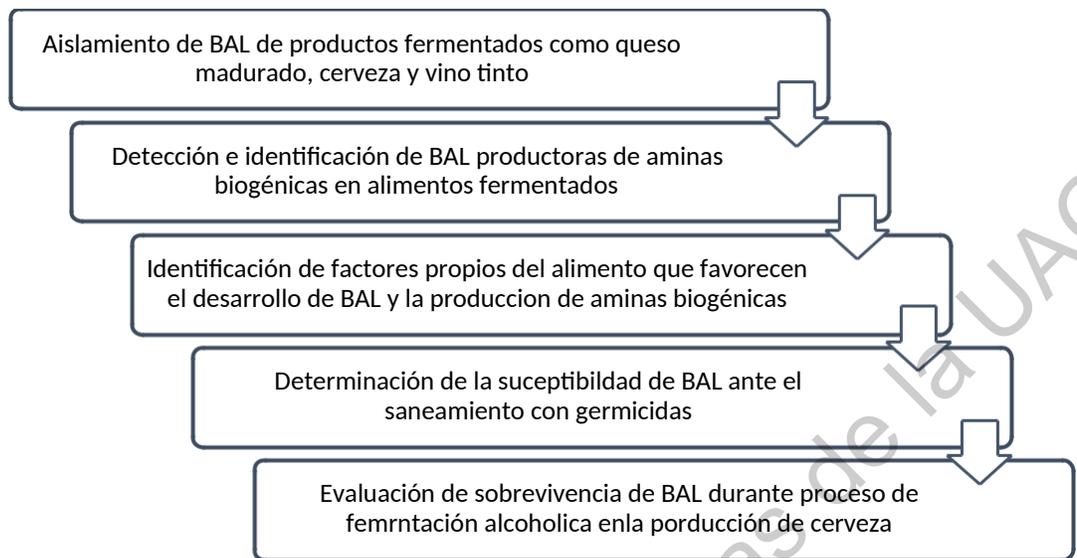


Figura 7. Esquema general de trabajo para la realización del proyecto.

5.2.2 Procedimientos generales

5.2.2.1 Conservación de cepas

Las cepas aisladas se mantuvieron en condiciones de congelación (-20 °C) en CMRS con 15% de glicerol.

5.2.2.2 Activación de cepas

Las cepas conservadas se reactivaron mediante tres transferencias sucesivas de 50 µL a 5 mL de CMRS con incubación a 30 ± 2 °C por 48 horas.

5.2.2.3 Lavado de cepas

Un mililitro de cultivo celular activado se transfirió a tubos Eppendorf, se centrifugó a 12000 RPM por 2 min, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con diluyente de peptona (DP); este lavado celular se realizó tres veces consecutivas. La suspensión celular final se sometió a un recuento como se describe en la siguiente sección.

5.2.2.4 Recuento de células viables (sin cursivas)

El recuento de células viables se realizó por medio de una cuantificación en medio de cultivo sólido. Para ello se realizaron diluciones decimales en DP a partir de las suspensiones madre; luego se inocularon alícuotas de 100 μ L en agar MRS que se distribuyeron por extensión. Las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia a 30 °C \pm 2 °C por 48 \pm 2 h. Este procedimiento se aplicó en cualquier fase experimental donde se realizó cuantificación de BAL.

5.2.3 Aislamiento de BAL presentes en alimentos fermentados como queso madurado, cerveza y vino tinto.

5.2.3.1 Muestreo

La recolección de muestras de queso madurado se realizó en la Feria del Queso y Vino edición 2019 (mes de Junio), realizada en Tequisquiapan, Querétaro, donde productores artesanales y empresas productoras de quesos establecidas en el estado de Querétaro ofertaron sus productos. Se recolectarán 14 muestras diferentes de quesos madurados (3-8 meses maduración) en total.

5.2.3.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas

A partir de las muestras de queso madurado se preparó una suspensión 10% p/v con amortiguador de fosfatos (0.5 M, pH 7.2) que se homogenizó automáticamente en un Stomacher® a alta velocidad durante 1 min. Posteriormente se realizaron diluciones decimales en DP, a partir de las cuales se llevó a cabo el aislamiento.

A partir de diluciones seleccionadas de los alimentos homogenizados se cuantificaron las BAL en AMRS. Las colonias se caracterizaron considerando su morfología, tinción de Gram y la reacción de catalasa con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Se aislaron al menos una colonia de cada morfología diferente y 10% del total de las colonias presentes en las placas de MRS cuya cuenta se encontró

entre 10 y 200. Las colonias se purificaron AMRS, se hicieron crecer en CMRS y se almacenaron en congelación (-20 °C).

5.2.4 Detección de genes asociados a la producción de AB en cepas de BAL

5.2.4.1 Obtención de ADN

Con la finalidad de detectar aquellas cepas de BAL capaces de producir AB, se aplicó una prueba de PCR dirigida a detectar los genes responsables de producción de AB (De las Rivas. *et al.*, 2006). Se realizó una activación de cepas y una vez activadas 1mL del cultivo de cada cepa se transfirió a tubos Eppendorf®. Se realizaron 3 lavados celulares a 12000 g durante 2 minutos decantando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en agua destilada libre de DNAsas. Posteriormente, se agregaron 300 µL de TNES y se agitó en un vortex por 5 min, se colocó en termobloque Ependorf® a 95 °C x 10 min, se centrifugó nuevamente (12000g x 10 min), después se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo (aprox. 300 µL) y se le añadió 80 µL de acetato de sodio 3 M y se incubó a -20 °C por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a (12000g x 10 min), y una vez más se recuperó el sobrenadante, se le añadieron 800 µL de etanol absoluto, se agitó suavemente de forma manual y se llevó a incubación por 10 min a -20 °C, con una centrifugación posterior (12000g x 10 min). Se eliminó el sobrenadante, se agregó a la pastilla formada 1 mL de etanol 70 %, se agitó suavemente, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó (12000g x 10 min). Se eliminó el sobrenadante, se secó en termobloque Ependorf® a 50 °C y finalmente se resuspendió en 50 µL de TE (Soto et al. 2015).

5.2.4.2 Prueba de PCR dirigida a genes asociados a la producción de AB

Una vez obtenido el ADN cromosómico de las cepas de BAL, se procedió a realizar una prueba de PCR múltiple y tres PCR simple, todas ellas dirigidas a identificar genes asociados a la producción de AB. Los iniciadores a empleados en la PCR para detección de AB se especifican en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los iniciadores para la detección de los genes de BAL asociado a la producción de AB.

| GEN | INICIADOR | SECUENCIA | TAMAÑO | TÉCNICA PCR |
|-------------------|-----------|-------------------------|---------|-------------|
| HISTIDINA | HDC3 | GATGGTATTGTTTCKTATGA | 435 pb | Múltiple |
| | HDC4 | CCAAACACCAGCATCTTC | | |
| TIRAMINA | TD2 | ACATAGTCAACCATRTTGAA | 1133 pb | Múltiple |
| | TD5 | CAAATGGAAGAAGAAGTAGG | | |
| CADAVERINA | CadAf | GCTGGGTTCACTGCTGGA | 220 pb | Simple |
| | CadAr | TGGCGTAATGTAGCTCATCA | | |
| | Cad2F a | CAYRTNCCNGGNCAAYAA | | |
| | Cad2Ra | GGDATNCCNGGNGGRTA | | |
| PUTRESCINA | ODC1 | NCAYAARCAACAAGYNGG | 900 pb | Múltiple |
| | ODC2 | GRTANGGNTNNGCACCTTC | | |
| | ODF | CATCAAGGTGGACAATATTTCCG | 500 pb | Simple |
| | ODR | CCGTTCAACAACCTTGTTTGCA | | |

(Li et al., 2019; Elsanhoty *et al.*, 2016; Li L et al., 2019; Guarcello *et al.*, 2016; De las Rivas *et al.*, 2006)

Las amplificaciones se realizaron con una mezcla de reacción de 25 µL que incluía GoTaq Green Master Mix 2X (Promega), 1 µM de cada iniciador y 1 ng de lisado celular de cada una de las muestras.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 53 °C y 2 min a 72 °C, y un paso de

extensión final de 20 min a 72 °C (De las Rivas. *et al.*, 2006). Los productos de la PCR se evidenciaron mediante electroforésis en geles de agarosa al 2.5% y 50 V / 45 min en presencia de 3 µL de SyberSafe® para tinción de las bandas que posteriormente fueron observadas en un fotodocumentador UV (De las Rivas *et al.*, 2005).

5.2.4.3 Identificación de BAL productoras de aminas

Las 15 cepas aisladas de cerveza y las 4 aisladas de queso que presentaron genes de AB fueron identificadas mediante la prueba de PCR múltiple propuesta por Petri *et al* (2013). Para ello, se tomaron alícuotas de 1mL de los cultivos previamente activados en caldo MRS y se realizaron tres lavados celulares como se describe en 5.2.2.3. Las mezclas de reacción para PCR estuvieron conformadas por 15 µL cuya su composición fue la siguiente: 12.5 µL de Qiagen Multiplex Mastermix), 2.5 µL de cada una de las dos mezclas con los iniciadores (a una concentración 2 µM)(Mezcla I / II), 9 µL de H2O y 1d µL de ADN extraído. LOS iniciadores que se emplearon se muestran en la Tabla 4 y las condiciones de la prueba de PCR en la Tabla 5.

Tabla 4. Iniciadores de PCR Múltiple para BAL.

Mezcla I

| | | |
|-------------|-----------------------|--------------------------|
| SCAR-OENI-F | GGTAGATTAACCCGCGACG | <i>O. oeni</i> |
| SCAR-OENI-R | GGAATCGGTAGCATCCTG | |
| SCAR-LBR-F | GGAAGATCAAGAATATCGGTG | <i>Lb. brevis</i> |
| SCAR-LBR-R | GCGTCTCTAATTCAGTGC | |
| SCAR-LPL-F | GAAGATTTGCCATCGGTG | <i>Lb. plantarum</i> |
| SCAR-LPL-R | CGTTTGATGGTAGCGTTGC | |
| SCAR-LEU-F | GTGGTCATGGGTCTTAGC | <i>Lc. mesenteroides</i> |
| SCAR-LEU-R | GGATCAAGACTAGCCAATGG | |
| SCAR-WPA-F | GCTGATGAACCCATACCTC | <i>W.</i> |

| | | |
|------------|-------------------------|--------------------------|
| SCAR-WPA-R | GACCTGATTCGCTCGTTG | <i>paramesenteroides</i> |
| SCAR-PDA-F | GTCTAAACTGGTGGTTAAACG | <i>P. damnosus</i> |
| SCAR-PDA-R | ATCGCACCTGGTTCAATGC | |
| SCAR-PPA-F | GCATGAATCACTTTTCGCTC | <i>P. parvulus</i> |
| SCAR-PPA-R | CAAAGATTGTGACCCAGTTG | |
| Mezcla II | | |
| SCAR-LBU-F | CTATCTTTAACCGCATTGCCG | <i>Lb. Buchneri</i> |
| SCAR-LBU-R | GACACGCTTCTCATGATTGTC | |
| SCAR-PAC-F | ATGATGGACAGACTCCCTG | <i>P. acidilactici</i> |
| SCAR-PAC-R | CGAGCTGCGTAGATATGTC | |
| SCAR-LBH-F | TTCCTTGTAATGTGCTTGC | <i>Lb. hilgardii</i> |
| SCAR-LBH-R | AATGGCAATCGCAATGGACG | |
| SCAR-PIN-F | CTATCCTTACAATGTGCATCG | <i>P. inopinatus</i> |
| SCAR-PIN-R | TGGTGCGTCAGTAAATGTAAG | |
| SCAR-LCU-F | CCAGATCCATCAGAAGATACG | <i>Lb. curvatus</i> |
| SCAR-LCU-R | GCTAACTTACCACTAACGACC | |
| SCAR-PPE-F | GGGAACGGTTTTAGTTTTATACG | <i>P. pentosaceus</i> |

(Petri *et al.*, 2013)

Tabla 5. Condiciones de PCR Múltiple

| Etapa / Técnica | Desnat. inicial | Ciclos | Desnat. | Hibridaci ón | Extensió n | Extensión final |
|--------------------|--------------------|---------|-----------------|--------------------------|------------------|--------------------|
| PCR múltiple | 95°C (5 min) | 13 y 21 | 95°C (1 min) | 39 y 41 °C (1 min) | 72 °C (2 min) | 72 °C (10 min) |

(Petri *et al.*, 2013)

5.2.5 Determinación de las condiciones y factores en el alimento que pueden influenciar la producción de aminas biogénicas por cepas de BAL

5.2.5.1 Evaluación del efecto de diversos factores propios del alimento que pueden influenciar el desarrollo de BAL y la producción de AB

Se evaluó en medio de cultivo los factores más importantes de los alimentos fermentados queso y cerveza (pH, la concentración de alcohol y de NaCl). En el caso específico del queso se consideró la concentración de NaCl y el pH con distintos niveles seleccionados (Izquierdo *et al.*, 2003) (Tabla 7). Mientras que para cerveza se evaluaron los factores de pH y concentración de etanol mostrados en la Tabla 6 (Tenorio *et al.*, 2014). En ambos casos, los factores se evaluaron inicialmente de forma independiente, es decir, factor por factor, esto con la finalidad de eliminar aquellas cepas con demasiada susceptibilidad, para posteriormente evaluar de forma bifactorial los factores seleccionados para cada caso en las cepas previamente identificadas en la sección 4.2.4 .

Tabla 6. Factores y tratamientos de estudio en cepas aisladas de cerveza

| Factor | Intervalo |
|------------------------------|-----------|
| pH | 4 - 7 |
| Concentración de alcohol (%) | 4-10 |

Tabla 7. Factores y tratamientos de estudio en cepas aisladas de queso

| Factor | Intervalo |
|---------------------------|-----------|
| pH | 4 - 7 |
| Concentración de NaCl (%) | 2 - 4 |

Esta evaluación se realizó utilizando como testigos a cepas portadoras de los genes asociados a la producción de AB (4.2.3) y con una cepa de *Lactobacillus 30a* (ATCC 3322) como control positivo de producción de AB.

El CMRS se ajustó a los niveles de pH con ácido láctico, etanol y NaCl seleccionados y se colocaron 175 μ L del caldo ajustado correspondiente a cada uno de los 96 pocillos de la microplaca empleada. Posteriormente se agregó el inoculó necesario para lograr 1.5×10^8 log UFC/mL de cada cepa en el pocillo correspondiente. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se incubaron a 30°C por 48 h. Al término del tiempo de incubación se determinó la densidad óptica a 600 nm mediante el equipo Synergy HT. Al resultado obtenido se le restó la densidad obtenida en el pocillo control que contenía el medio.

Como control de desarrollo se empleó CMRS a condiciones estándar (sin adición de etanol, ácido láctico, y NaCl) para cada una de las cepas.

5.2.5.2 Determinación de aminas biogénicas mediante HPLC

Una vez conocidas las condiciones óptimas para desarrollo de BAL en base al punto 5.2.4.1 estas mismas condiciones se replicaron, por lo cual se procedió a escalar el ensayo a matraces con un volumen de 50 mL de CMRS ajustado a las condiciones estipuladas en el punto 5.2.4.1 con el fin de evaluar bajo éstas mismas la producción de AB y se procedió a incubar a 30 °C durante 48 h.

Posteriormente se tomaron alícuotas de 3 ml de cada uno de los cultivos a las 24 y 48 h de incubación, las cuales fueron conservadas en congelación y posterior a la congelación se sometieron a baño maría a 75 °C por 15 min con la finalidad de inactivar las BAL. Los cultivos se centrifugaron a 4000 g x 15 min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, estas muestras fueron tratadas con orto-ftalaldehído (OPA), para lo cual, el reactivo de derivatización OPA se preparó como lo indican Smela *et al.* (2003) disolviendo 27 mg de o-ftaldehído en 0,5 mL de etanol (99%), agregando 20 μ L 2-mercaptoetanol (pureza > 98), y se aforó a volumen de 5 mL con tampón de borato 0,4 M (pH 9,5 ajustado por NaOH 1 M). Los 3 mL del extracto se

mezclaron con 1 mL de OPA y después del tiempo de reacción (2 min), la mezcla se hizo pasar por una columna HLB OASIS® previamente acondicionada con metanol y agua. Después de pasar por la columna HLB la muestra se inyectó en la columna cromatográfica Agilent Technologies XDB-C8 LC (150 × 4.6 mm, 5 µm, PN 993967–906) acoplada a fluorescencia (G1321A) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), donde los metabolitos de interés se detectaron por fluorescencia usando 330 nm y 440 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. Las aminas separadas se identificaron comparando sus tiempos de retención con los de los patrones y comparando con los tiempos definidos por Smela *et al.* (2003). Como gradiente de elución se emplearon acetato 100 mM como fase móvil y acetonitrilo a un caudal de 0,6 mL / min.

5.2.5.3 Evaluación de la sobrevivencia de BAL productoras y no productoras de AB durante el proceso de elaboración de cerveza

Se realizó una selección de las tres cepas de BAL con mayor capacidad de desarrollo y producción de AB. Dichas cepas se sometieron a desarrollo en CMRS en presencia de rifampicina iniciando en 50 ppm y al cabo de tres activaciones (aumentando gradualmente en múltiplos de 50 ppm del antibiótico) se llevó a un CMRS con 150ppm de rifampicina, esto con la finalidad de inducir la resistencia a dicho antibiótico y poder diferenciar las BAL inoculadas de las que pudieran estar presentes en la matriz alimentaria. Posteriormente se realizó una mezcla que las contuviera en totalidad y como control se mantuvo de forma individual a la cepa con mayor capacidad de producción de AB. Estos dos inóculos se adicionaron al mosto previo a iniciar la fermentación; el inóculo aplicado se encontró entre 5 y 6 log UFC/ml en un volumen de 900 ml de mosto; posteriormente el mosto se llevó a fermentación durante 14 días a temperatura ambiente, esto con la finalidad de evaluar el desarrollo de las BAL durante el proceso fermentativo. Durante el periodo de incubación se tomaron muestras para observar la evolución de los parámetros

físicos y químicos de la matriz alimentaria, además de realizar una cuantificación de células viables como se describe en 5.2.2.4 para ver la sobrevivencia de las BAL.

5.2.6 Evaluación de la susceptibilidad de diversas cepas de BAL ante la acción de germicidas en superficies de acero inoxidable

5.2.6.1 Preparación de inóculo de BAL

Con base a las capacidades de desarrollo y producción, tres cepas provenientes de quesos correspondientes a distintas especies y con capacidad de producción de AB fueron seleccionadas al igual que su contraparte de cepas no productoras de AB. Para el caso de las cepas aisladas de cerveza y de queso, se eligieron 3 cepas productoras y 3 no productoras de AB aisladas de cada uno de los alimentos. Las cepas seleccionadas fueron reactivadas, lavadas y cuantificadas en células viables como se menciona en el inciso 5.2.2. Posteriormente se realizaron 4 mezclas en función de la fuente de aislamiento y la capacidad de producción de AB, es decir una mezcla fue conformada por BAL productoras de AB provenientes de queso, otra por BAL no productoras de AB provenientes de queso, la tercera por BAL productoras de AB provenientes de cerveza y la última por BAL no productoras de AB aisladas de cerveza, las cepas fueron mezcladas en volúmenes y concentraciones iguales.

5.2.6.2 Susceptibilidad de BAL a germicidas en superficies de acero inoxidable

Para esta prueba se emplearon esferas de acero inoxidable (5/32 in. de diámetro), las cuales se inocularon mediante inmersión en suspensiones de las BAL previamente seleccionadas con base a su capacidad de producción de AB ($\sim 10^9$ UFC/mL), dichas cepas fueron activadas y lavadas como se describió en 5.2.2.2 y 5.2.2.3. Cada unidad experimental consistió de 5 esferas de acero inoxidable inmersas en 1 mL de la suspensión de BAL por 120 min a temperatura de 35 °C para permitir la adhesión de las células a la superficie de las esferas. Las

se decantaron y se realizaron tres lavados a cada unidad 41

experimental aplicando solución salina para eliminar las células no adheridas. Posteriormente las esferas se colocaron en una caja de Petri sin tapa y se aplicó un secado en flujo laminar por 30 minutos. Una vez secas se sometieron al tratamiento con germicidas donde se evaluaron 4 distintos germicidas: agua electrolizada, cloro, ácido paracético, y sanitizante, a las concentraciones indicadas en la Tabla 8. Se incluyó un control de arrastre en el cual las células adheridas se expusieron a agua destilada en los mismos tiempos descrito para los desinfectantes.

Después del secado y de la aplicación de cada tratamiento se realizó la recuperación de las células sobrevivientes mediante remoción en vórtex durante 1 min en 500 μ L de caldo neutralizante. Posteriormente se llevó a cabo el recuento de células viables como se describe en 5.2.1.4.

Tabla 8. Concentraciones de germicidas a usar

| <i>Germicida</i> | <i>Concentración</i> |
|--------------------|----------------------|
| agua electrolizada | 2 % v/v |
| cloro | 200 ppm |
| ácido paracético | 80 ppm |
| esteriClean® | 2 % v/v |

5.2.6.3 Capacidad de formación de biofilm por BAL

Con la finalidad de evaluar la capacidad de formación de biofilm por parte de las BAL, se realizó una prueba en microplacas siguiendo la metodología establecida por Stepanovi *et al.* (2004), donde los pozos de la microplaca se llenaron con 230 μ L de AMRS, se añadieron 20 μ L de cultivo bacteriano perteneciente a las BAL seleccionadas y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Posteriormente se vertió la placa y los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ L de agua destilada estéril, después las bacterias adheridas se fijaron con 250 μ L de metanol durante 15 min para posteriormente vaciar el metanol. Las microplacas se tiñeron con 250 μ L por pocillo de cristal violeta durante 5 min para luego ser enjugadas con agua de grifo.

Finalmente, las células adherentes se resolubilizaron con 250 μ l de 33% (v/v) ácido acético glacial por pocillo y se procedió a determinar la DO a 570 nm.

5.2.7 Análisis estadístico

Para el caso de apartado de Caracterización de cepas de bacterias ácido lácticas productoras de aminos biogénicas (5.2.4) se evaluaron los factores concentración de NaCl, pH y concentración de alcohol por medio de un diseño de tratamientos en parcelas divididas fuente de aislamiento de las cepas fue la parcela y los otros factores como pH, alcohol y NaCl fueron las subparcelas, donde las combinaciones de estos factores estuvieron completamente aleatorizadas: la variable de respuesta fue la producción de AB.

En la evaluación de la eficiencia de germicidas los factores de estudio fueron el germicida empleado y las BAL productoras o no productoras de AB, la variable evaluada fue la reducción logarítmica de las poblaciones, se realizó un análisis de varianza de Fisher y una prueba de medias de Tukey, así como un análisis de interacción entre factores.

Cada experimento se repitió al menos tres veces y en todos los casos para los análisis estadísticos se utilizó el programa Rstudio Version 1.1.45.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Aislamiento e identificación de cepas de BAL a partir de quesos artesanales madurados, cerveza y vino tinto artesanal.

6.1.1 Diversidad de cepas de BAL aisladas a partir de quesos artesanales madurados y cerveza artesanal

Como parte fundamental del estudio, se llevó a cabo la recolección de quesos madurados elaborados de forma artesanal en la Feria del Queso y Vino edición 2019 realizada en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro durante el mes de Junio. Se recolectaron 14 quesos con distintos periodos de maduración (entre 3 y 8 meses). Se recolectaron únicamente 5 vinos debido a que, para aumentar la posibilidad de aislar BAL se eligieron aquellos que carecían de sulfitado, pues es bien sabido que el sulfito cumple funciones como una agente antioxidante y como agente antiséptico durante el proceso de elaboración de vinos. A partir del recuento de BAL en agar MRS, se realizó el aislamiento de 43 cepas de BAL procedentes de queso y únicamente se lograron aislar 5 cepas de BAL de las muestras de vino. En el caso de cerveza se emplearon 25 cepas de BAL aisladas en trabajos previos por el equipo de trabajo, las cuales fueron seleccionadas por presentar capacidad para desarrollar en presencia de etanol y a bajos niveles de pH. Una vez obtenidos los aislamientos de supuestas BAL se procedió a realizar tinción de Gram y la prueba de catalasa (H_2O_2 al 3%) con la finalidad de realizar un primer tamizaje para descartar aquellas que no presentaran características típicas de BAL (Gram positivo y catalasa negativa).

Para la identificación de las BAL mediante la prueba de PCR múltiple, se usaron controles positivos ADN correspondiente a *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* y *Lb. Hilgardii* (Petri *et al.*, 2013). Los amplicones deberían presentar tamaños de 1362 pb, 1113 pb y 684 pb, respectivamente. sin embargo, al momento de correr en geles de agarosa al 1.5% los productos obtenidos de PCR para el caso del control *Lb.*

plantarum, se observó que la banda correspondiente presentaba un peso ligeramente menor de aproximadamente 900-1000 pb como se puede ver en la Figura 8. Esto pudo deberse a diversos factores, como son los cambios de voltaje en la cámara electroforética, los cambios de temperatura, la viabilidad del buffer de carga e incluso la concentración del buffer de corrida empleado, los cuales influyen en la separación de las bandas debido a que afectan directamente la movilidad electroforética (Heng Ver *et al.*, 2019). Sin embargo, a pesar de estas diferencias fue posible identificar las diferentes bandas correspondientes a cada uno de los amplicones de los controles usados así como el asignar identidad mediante ésta técnica a los aislamientos obtenidos a partir de los alimentos fermentados. Por ejemplo, se tiene el caso del aislamiento obtenido a partir de queso y ubicado en el carril 5 de la Figura 8, el cual presentó un amplicón de aproximadamente 1362 pb, por lo cual se le asignó la identidad de *Lb. brevis* que coincide con la morfología observada en la prueba de tinción de Gram, de igual forma que fue posible otorgar especie de *P. parvulus* al aislamiento obtenido de vino (Carril 7 en Figura 8).

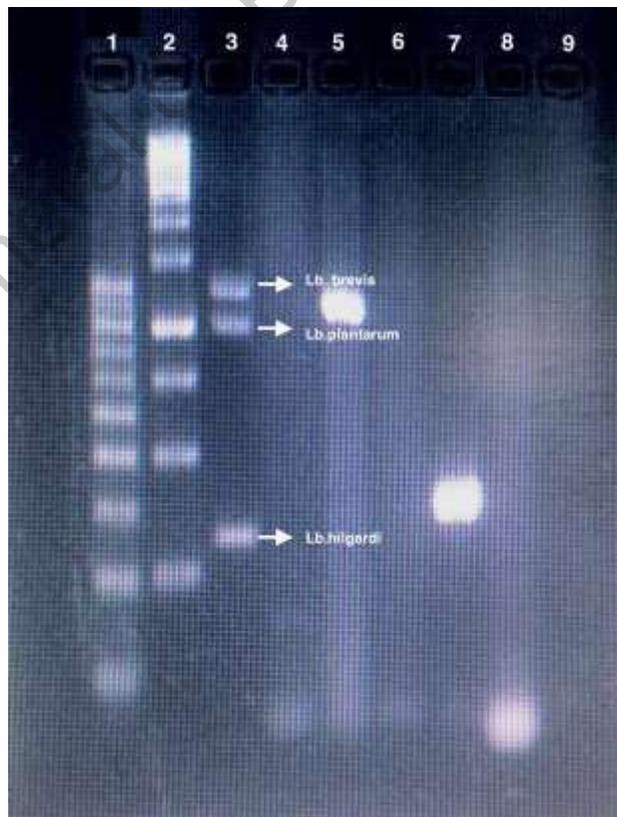


Figura 8. Identificación de aislados a partir de queso y cerveza mediante PCR.

Carril 1: marcador de peso molecular (100pb); carril 2: marcador de peso molecular (200pb); carril 3: controles para *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* y *Lb. hilgardi*; carril 4-9: aislamientos de queso y cerveza; carril 5: *Lb. hilgardi*; carril 7: *P. parvulus*.

A partir de la prueba de PCR múltiple fue posible otorgar una identidad a los aislamientos en conjunto con la morfología observada en la prueba de tinción de Gram, a excepción de 13 cepas provenientes de queso y 11 de cerveza que no pudieron ser identificadas mediante esta técnica, lo cual sugiere que podrían ser BAL pertenecientes a alguna especie no incluida en esta técnica, ya que la prueba se limita a la identificación de 13 especies. Para el caso de los aislamientos de queso fue posible identificar un 71% de total de cepas, de las cuales 7 cepas se identificaron como *Lc. mesenteroides* (16%), 6 cepas como *Lb. plantarum* (14%), 5 cepas como *O. Oeni* (12%) y 5 cepas como *Lb. brevis* (12%), 3 *Lb. hilgardi* (7%) y 2 cepas de *Lb. curvatus* y *P. Inopinatus* (5% cada uno).

De las cepas provenientes de cerveza se logró identificar el 56% del total de aislamientos, siendo *O. oeni* la especie más abundante (32% de incidencia, seguido de *Lb. brevis* con 5 aislamientos (20%) y en la menor incidencia la presentó *Lc. mesenteroides* con apenas 1 aislamiento (4%).

Por último, en el caso de BAL aisladas a partir de vino tinto se lograron obtener únicamente 6 aislamientos, de los cuales 3 dieron positivo a alguna de las 13 especies identificadas (50%) por la prueba de PCR, donde 1 se identificó como *Lc. mesenteroides*, otra como *O. oeni* y la restante *P. parvulus*, aportando así cada una con un 17%.

Como podemos observar en la Tabla 9, la diversidad de microorganismos aislados es bastante amplia, sin embargo, se observa que para el caso de cerveza el microorganismo más abundante fue *O. Oeni*, lo cual corresponde a lo reportado en la literatura que se encuentra presente en bebidas alcohólicas (Gardini *et al.*,

2005), caso contrario ocurre con *P. parvulus* que no es un microorganismo comúnmente reportado en este tipo de bebidas. Respecto a los aislamientos de queso, *Lc. mesenteroides* fue la BAL más abundante a pesar de que *Lb. plantarum* y *Lb. curvatus* han sido los microorganismos ampliamente encontrados en otras investigaciones como cultivos no iniciadores (Pachlová *et al*, 2018); esto puede deberse a que *Lc. mesenteroides* a pesar de no ser un cultivo iniciador clásico, recientemente se ha comenzado a incorporar para favorecer el desarrollo de aromas en quesos madurados (Mastrigt *et al.*, 2019). Sin embargo, este mismo microorganismo (*Lc. mesenteroides*) también se asocia fuertemente a deterioro, por lo cual su presencia podría ser indicio de mala manipulación del alimento.

Tabla 9. Identificación mediante PCR de BAL aisladas a partir de alimentos fermentados.

| Alimento | Número de cepas | Identificación de BAL | | | | | | | |
|----------|-----------------|--------------------------|----------------------|-----------------|-------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|
| | | <i>Lc. mesenteroides</i> | <i>Lb. plantarum</i> | <i>Lb. oeni</i> | <i>Lb. brevis</i> | <i>Lb. hilgardii</i> | <i>Lb. curvatus</i> | <i>Lb. inopinatus</i> | <i>P. parvulus</i> |
| Queso | 43 | 7* | 6 | 5 | 5 | 3 | 2 | 2 | 0 |
| Cerveza | 25 | 1 | 0 | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Vino | 6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

*El número corresponde a la cantidad de aislamientos identificados en esa especie

6.1.2 Detección de genes asociados a la producción de AB en BAL aisladas de alimentos fermentados.

Una vez obtenidos e identificados los aislamientos de BAL, se procedió a detectar aquellas con potencial para la producción de AB mediante la técnica de PCR múltiple dirigida a genes asociados a la producción de histamina, tiramina y putrescina. Estas 3 AB son las de mayor reporte de incidencia en alimentos fermentados en conjunto con cadaverina según Bonkova *et al.*, (2013); por ello, adicionalmente se investigaron la presencia de los genes asociados a putrescina y cadaverina de forma independiente (Li *et al.*, 2019; Elsanhoty *et al.*, 2016; Li L *et al.*, 2019; Guarcello *et al.*, 2016).

Los iniciadores dirigidos a los genes de asociados a la producción de cadaverina (CadAf / CadAr, Cad2F a / Cad2R y ODF / ODR) presentaron una buena hibridación con secuencias de diversas BAL al someterse a un PCR *in silicio* haciendo uso de secuencias conocidas para algunas BAL productoras de AB ubicados en Gen Bank. En el caso de nuestro trabajo, no fue posible obtener amplificaciones en PCR convencional. Este resultado pudo deberse a que el gen simplemente no está contenido en el material genético cromosómico de la BAL o algún fallo en el diseño del par de iniciadores, o a que los genes más abundantes como histamina y tiramina consumieron rápidamente los reactivos de la mezcla limitando así la amplificación para el amplicón correspondiente a esta amina biogénica, mejor conocido como amplificación preferencial (Sint *et al.*, 2012). Es importante mencionar que para algunos casos las bandas fueron muy notorias como es el caso de la banda correspondiente a tiramina de la cepa 19C (carril 5 Figura 9), mientras que en otros casos la banda fue casi indistinguible como para 7C, Q10 y Q18 (carriles 3,6 y 7 respectivamente). La técnica de PCR múltiple nos permitió identificar aquellas cepas con la capacidad genética para producir histamina, tiramina y putrescina, lo cual resultó bastante útil para los objetivos de nuestra investigación, pues aunque cadaverina y putrescina son de interés al potencializar los efectos de histamina y tiramina, estas dos últimas son tóxicas de forma individual.



Figura 9. Productos de la prueba PCR múltiplex dirigida a genes asociados a la producción de aminas biogénicas.

Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); carril 2: cepa control de producción de Histamina (ATCC 33222); carril 3-5: cepas aisladas a partir de queso (Q10, Q18, Q38); carril 6-8: cepas aisladas a partir de cerveza (7C, 18C, 19C).

Se obtuvieron 3 de 45 (6.6%) cepas positivas para al menos un gen asociado a producción de AB a partir de queso. Los quesos de los cuales se obtuvieron dichas cepas fueron queso manchego con maduración de tres meses y queso tipo cantal con ocho meses de maduración (Tabla 10). Se reconoce que los quesos madurados presentan una mayor incidencia de AB en comparación a los quesos frescos (Bunklova *et al.*, 2010), debido que el desarrollo de microorganismos con actividad descarboxilasa se ve favorecido en la maduración, la cual suele llevarse a

cabo en condiciones de temperatura y humedad relativa apropiadas para el desarrollo microbiano (Renes *et al.*, 2014).

Para el caso de BAL aisladas a partir de cerveza se obtuvieron 15 de 25 (60%) cepas con genes para producción de AB (Tabla 10). Finalmente, en el caso de las cepas aisladas a partir de vino (6 cepas) no se logró identificar ninguna con capacidad genética para producir AB, por lo cual en los experimentos sucesivos se continuó únicamente con cepas de BAL aisladas a partir de cerveza y quesos madurados.

Tabla 10. BAL aisladas de con genes asociados a producción de AB, aisladas a partir de quesos madurados y cerveza artesanales.

| Código cepa | Fuente | Microorganismo * | Genes asociados a producción de AB** |
|-------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------------|
| ATCC | ATCC | <i>Lb. spp</i> | Putrescina, histamina |
| Q10 | Queso manchego+ | <i>Lc. mesenteroides</i> | Putrescina, tiramina, histamina |
| Q18 | Queso manchego+ | <i>Lc. mesenteroides</i> | Tiramina |
| Q38 | Queso Cantal ++ | <i>O. oeni</i> | Putrescina, tiramina |
| C2 | Cerveza | <i>O. oeni</i> | Tiramina |
| C4 | Cerveza | <i>O. oeni</i> | Tiramina |
| C7 | Cerveza | <i>O. oeni</i> | Tiramina |
| C9 | Cerveza | <i>O. oeni</i> | Tiramina |
| C11 | Cerveza | <i>O. oeni</i> | Tiramina |
| C12 | Cerveza | <i>O. oeni</i> | Tiramina |
| C13 | Cerveza | <i>L. brevis</i> | Tiramina |
| C14 | Cerveza | — | Tiramina |
| C16 | Cerveza | <i>L. brevis</i> | Tiramina |

| | | | |
|-----|---------|------------------|----------|
| C17 | Cerveza | — | Tiramina |
| C18 | Cerveza | — | Tiramina |
| C19 | Cerveza | <i>O. oeni</i> | Tiramina |
| C20 | Cerveza | <i>O. oeni</i> | Tiramina |
| C21 | Cerveza | <i>L. brevis</i> | Tiramina |
| C22 | Cerveza | <i>L. brevis</i> | Tiramina |

**Genes asociados a producción de aminas detectados por PCR múltiplex.

+ 3 meses de maduración ++ 8 meses de maduración

Considerando las 18 cepas positivas con al menos un gen, se obtuvo que el 100% de las cepas presentaron el gen asociado a la producción de tiramina, mientras que solo dos cepas correspondientes a Q10 y Q38 (13.3%) mostraron presencia del gen asociado a la producción de histamina; para el caso de putrescina dos cepas presentaron el gen asociado a su producción (13.3%). Estos resultados se encuentran muy por encima de lo reportado en el estudio de Coton *et al.* (2009), pues para el caso de tiramina (Gen TD) tuvieron una incidencia del 8%, en la detección de genes asociados a histamina (Gen HDC) de sólo el 2% y finalmente un 0.5 de incidencia para el gen ODC (putrescina). Estas variaciones podrían deberse a que el mayor porcentaje de BAL con potencial para la producción de AB fueron procedentes de los aislamientos de cerveza, los cuales fueron previamente seleccionados por la capacidad de desarrollar a bajos niveles de pH y altas concentraciones de etanol. Según reporta Gardini *et al.*, (2005), el pH afecta severamente la actividad celular de los microorganismos, y estos responden generando compuestos para contrarrestar el ambiente ácido, entre ellos las AB.

6.2 Evaluación del efecto de diversos factores propios del alimento que pueden influenciar el desarrollo de BAL y la producción de AB

Las BAL poseen capacidad de adaptarse a diversos factores de estrés mediante variados mecanismos de acción o respuesta, como es el mecanismo

descrito para contrarrestar el pH bajo, el cual es regulado mediante la descarboxilación de aminoácidos libres, lo cual puede repercutir en la producción de AB (Romano *et al.*, 2014). Por ello, se realizaron pruebas para identificar aquellos factores y los niveles en que las células bacterianas de las cepas de BAL seleccionadas lograban ser sometidas a estrés suficiente para producir AB.

6.2.1 Pruebas de tolerancia a estrés por BAL aisladas de cerveza

Una vez obtenidas las cepas con la aparente capacidad genética para la producción de aminos biogénicas, se procedió a evaluar factores de estrés como el pH y contenido de etanol. Este ensayo se llevó a cabo en microplacas, donde el CMRS fue previamente ajustado a las condiciones seleccionadas adicionando etanol y ácido láctico.

Se ha reportado en la literatura que el ácido láctico es el ácido presente en cerveza y queso de forma más abundante (Sendra *et al.*, 1999; Heredia, 2011), principalmente en queso, con lo cual nos permitió generar condiciones similares a las que se encuentran en los alimentos.

Para la evaluación de cada uno de los de los factores, se sometieron 15 cepas provenientes de cerveza a la presencia de etanol (4%, 6% y 8%) y distintos niveles de pH (4, 5 y 6) de forma independiente. En la prueba de desarrollo en presencia de etanol todas las cepas estudiadas mostraron la capacidad de desarrollar a las concentraciones de 4% y 6% v/v de etanol, lo cual es compatible con el contenido habitual de etanol en cerveza; sin embargo, a una mayor concentración (8%) (que también puede ser encontrada en ciertos tipos de cervezas) sólo en tres cepas (C16, C20 y C21) no se observó capacidad para desarrollar (Figura 10), por lo cual estas cepas se descartaron para pruebas posteriores.

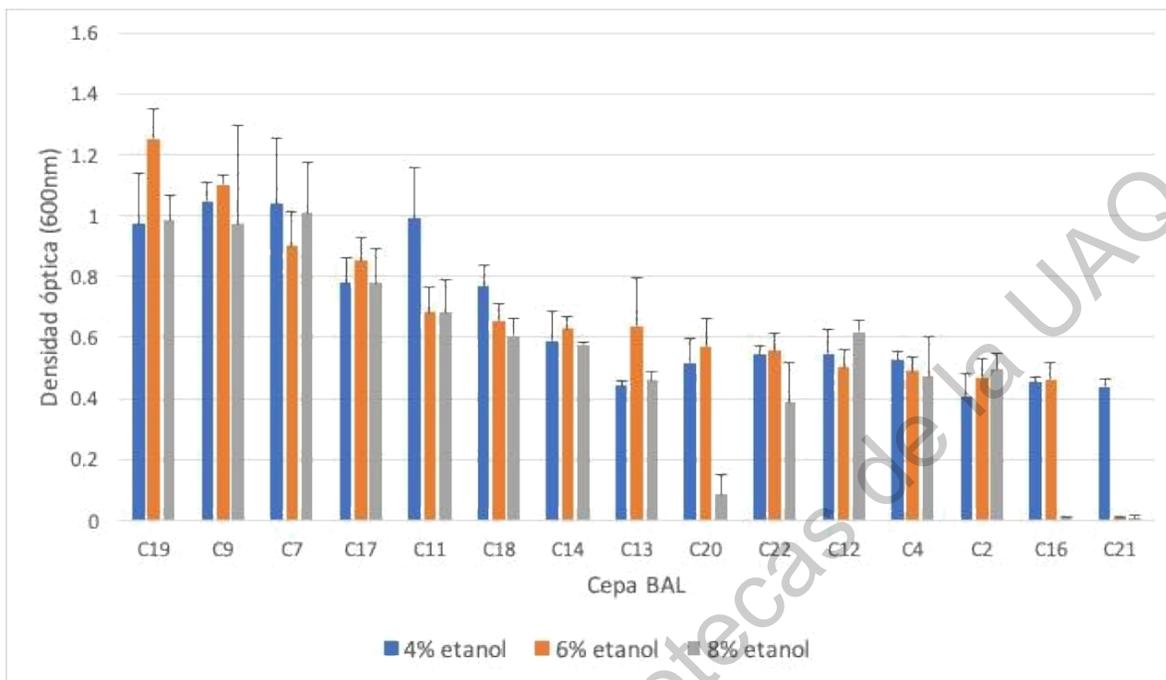


Figura 10. Desarrollo de BAL aisladas de cerveza en CMRS ajustado a diferentes concentraciones de etanol.

La figura representa la media de tres repeticiones de la DO alcanzada a 600nm tras 48 h de incubación a 35 °C, las barras representan el error estándar.

En la evaluación del factor pH, las 15 cepas estudiadas presentaron la capacidad de desarrollar a pH 6 y 5 como puede observarse en la Figura 11, lo cual era de esperarse pues el pH 6 se encuentra muy cercano al pH óptimo para el desarrollo de este grupo de bacterias (5.5-6.2), es importante mencionar, que en la mayoría de las cepas el máximo desarrollo se presentó a pH 5. Por otro lado, 7 cepas de BAL (C7, C9, C11, C14, C17, C18, C19) pudieron desarrollar aún a pH 4, lo cual representa una condición adversa para este tipo de microorganismos, pero coincide con lo encontrado por León *et al.* (2004), quienes refieren que las BAL estudiadas crecieron en un pH 4.0-4.5 en masas ácidas, pues ellas mismas generan estas condiciones con la producción de ácido láctico.

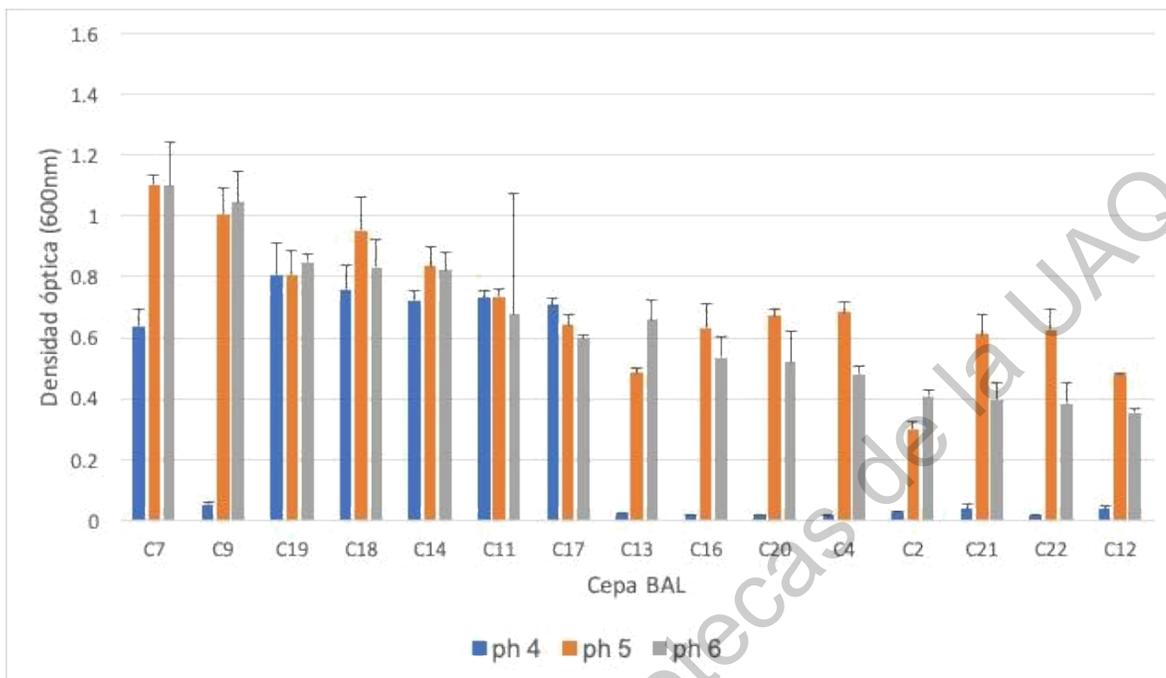


Figura 11. Desarrollo de BAL aisladas de cerveza en CMRS ajustado a diferentes niveles de pH.

La figura representa la media de tres repeticiones de la DO alcanzada a 600nm tras 48 h de incubación a 35 °C, las barras representan el error estándar.

Una vez evaluados los dos factores de estrés de forma individual y consecuentemente, se observó que el pH es el factor más limitante en comparación a la presencia de etanol, al menos para las cepas aisladas de cerveza, pues para el 53% de las cepas estudiadas el medio ajustado a pH 4 no permitió su desarrollo, comportamiento que no se observó en los distintos porcentajes de alcohol a los que se ajustó el CMRS donde etanol al 8% fue el nivel más limitante y sólo en 13% de las cepas no pudieron desarrollar en esta condición de estrés.

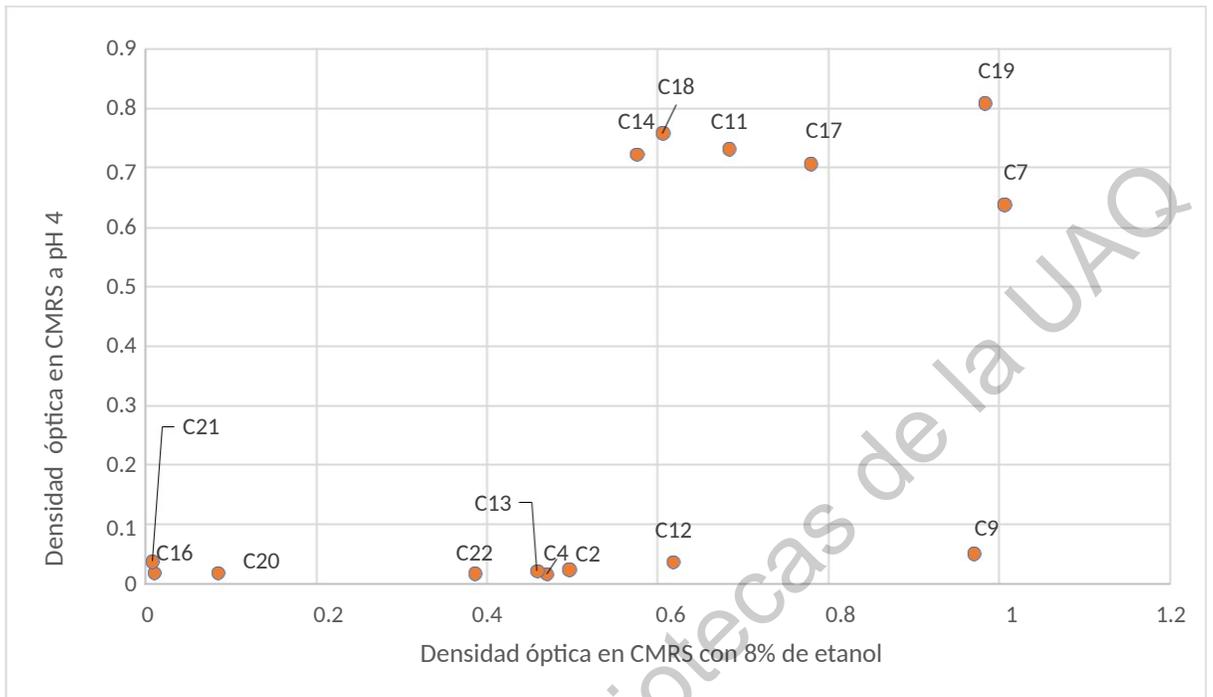


Figura 12. Correlación entre el desarrollo de BAL evaluado en CMRS ajustado a pH 4 y en CMRS ajustado a 8% de etanol.

Los puntos representan la media de tres repeticiones de la DO alcanzada a 600nm.

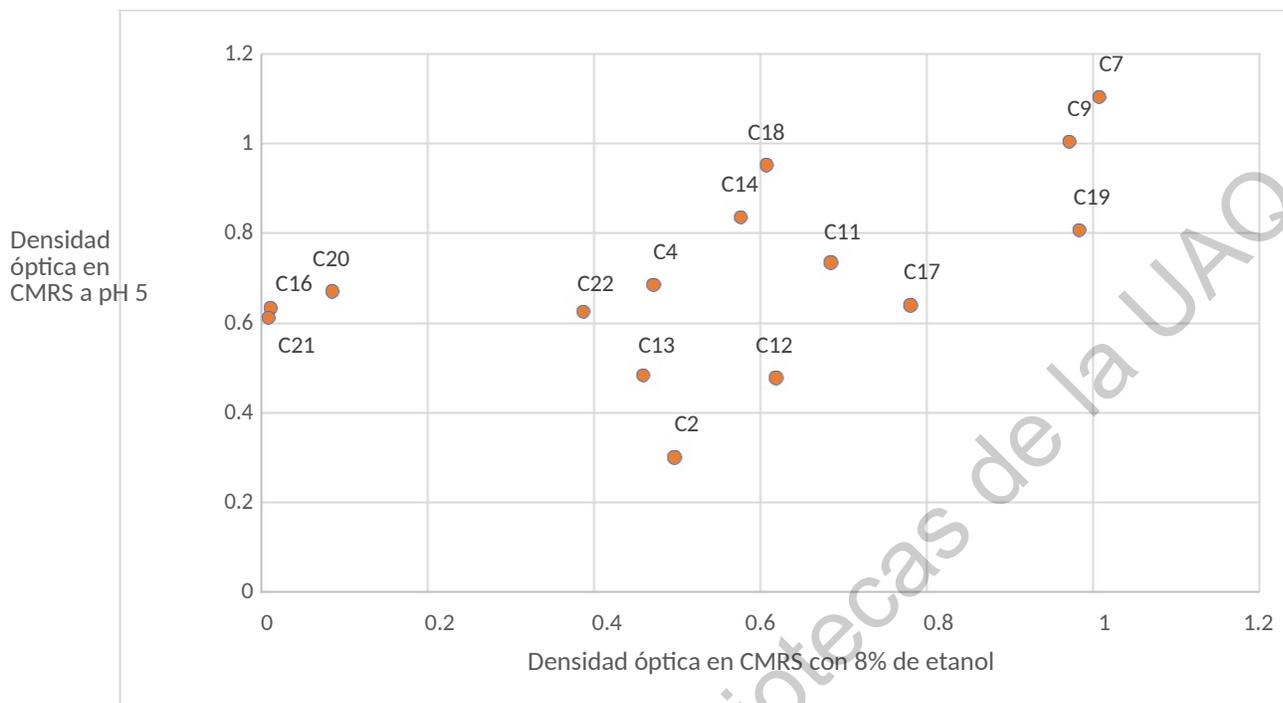


Figura 13. Correlación entre el desarrollo de BAL evaluado en CMRS ajustado a pH 5 y en CMRS ajustado a 8% de etanol.

Los puntos representan la media de tres repeticiones de la DO alcanzada a 600nm.

Para pruebas posteriores, se seleccionaron aquellas cepas que mostraron un buen desarrollo en presencia de cada uno de los factores en los distintos niveles, esto con la finalidad de reducir el número de cepas. Las cepas seleccionadas fueron 7, las cuales corresponden a C7, C9, C11, C14, C17, C18 y C19, pues a pesar de que la cepa 9C no exhibió un alto desarrollo a pH 4, a pH 5 y 6 alcanzó valores importantes de DO al igual que en la prueba con distintos porcentajes de etanol, esto puede observarse claramente en los gráficos 12 y 13 donde se exhiben las DO alcanzadas por cada una de las cepas a 8% de etanol que fue la máxima concentración empleada y a dos diferentes niveles de pH (4 y 5). Las cepas seleccionadas se pueden ubicar en su mayoría dentro del cuadrante superior derecho de las Figuras 12 y 13 que corresponde a los niveles de DO más altos.

6.2.2 Pruebas de tolerancia a estrés por BAL aisladas de quesos madurados

A diferencia de la presencia de etanol en cepas de cerveza, en las cepas de queso se evaluó el desarrollo en presencia de distintos porcentajes de NaCl (2%, 3% y 4%). Se estudiaron las tres cepas que contenían los genes asociados a la producción de AB y se observó desarrollo de las tres cepas en todas las condiciones (Figura 14). En dos cepas (Q10 y Q18) se observó claramente una reducción en la población máxima alcanzada al ir incrementando la concentración de NaCl. Q38 por su parte mostró su mayor población alcanzada en 3% de NaCl, pero en contraste con las otras cepas, fue la que mostró un menor grado de desarrollo en las tres condiciones.

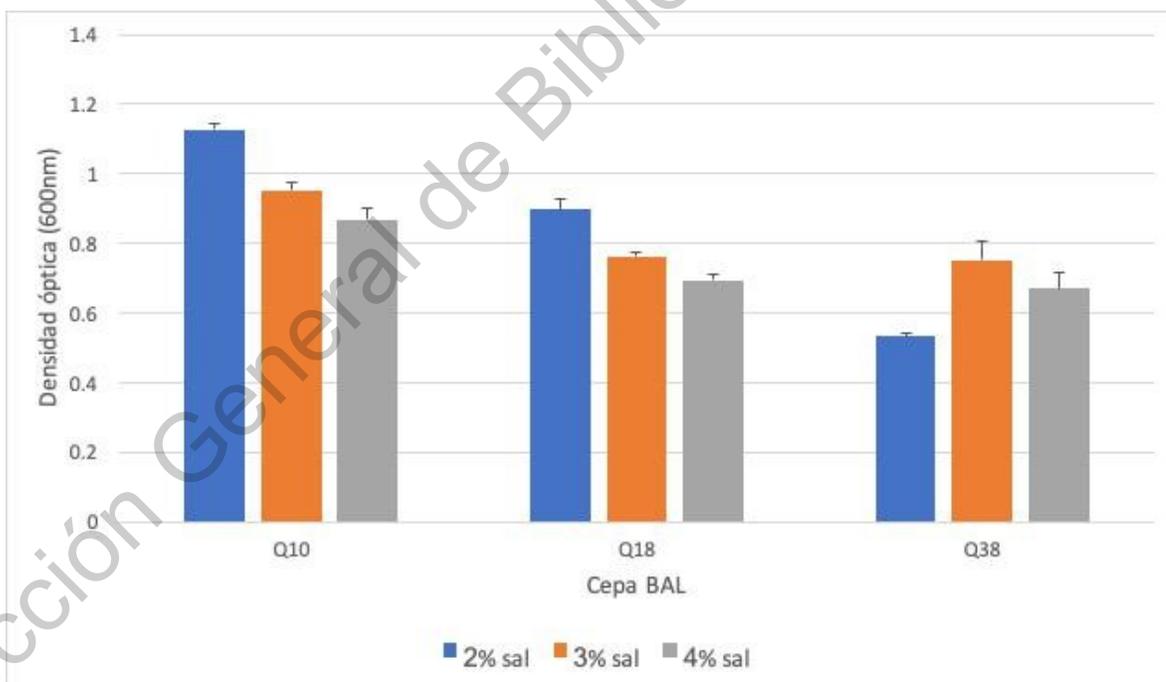


Figura 14. Desarrollo de BAL aisladas a partir de quesos madurados en CMRS ajustado a diferentes concentraciones de NaCl.

El gráfico representa la media de tres repeticiones de la densidad óptica alcanzada a 600nm, las barras de dispersión representan el error estándar.

Por otro lado, para la prueba de tolerancia al pH, dos de tres cepas mostraron mejor desarrollo a pH 5, con excepción de la cepa Q38, la cual desarrolló mejor a pH 6. A diferencia de las cepas aisladas a partir de cerveza, a las cepas aisladas a partir de quesos no les fue posible desarrollar de forma significativa a pH 4 (Figura 15), la cual fue la condición más extrema evaluada de este factor. Nuevamente Q38 fue la cepa que mostró la menor capacidad de desarrollo; lo cual refuerza lo observado en las pruebas realizadas en cepas de cerveza, que el pH es un factor de estrés que puede condicionar el desarrollo de las cepas y lo cual coincidió con lo encontrado por León *et al.*, (2004). Debido al reducido número de cepas evaluadas, se continuó trabajando con las 3 cepas iniciales.

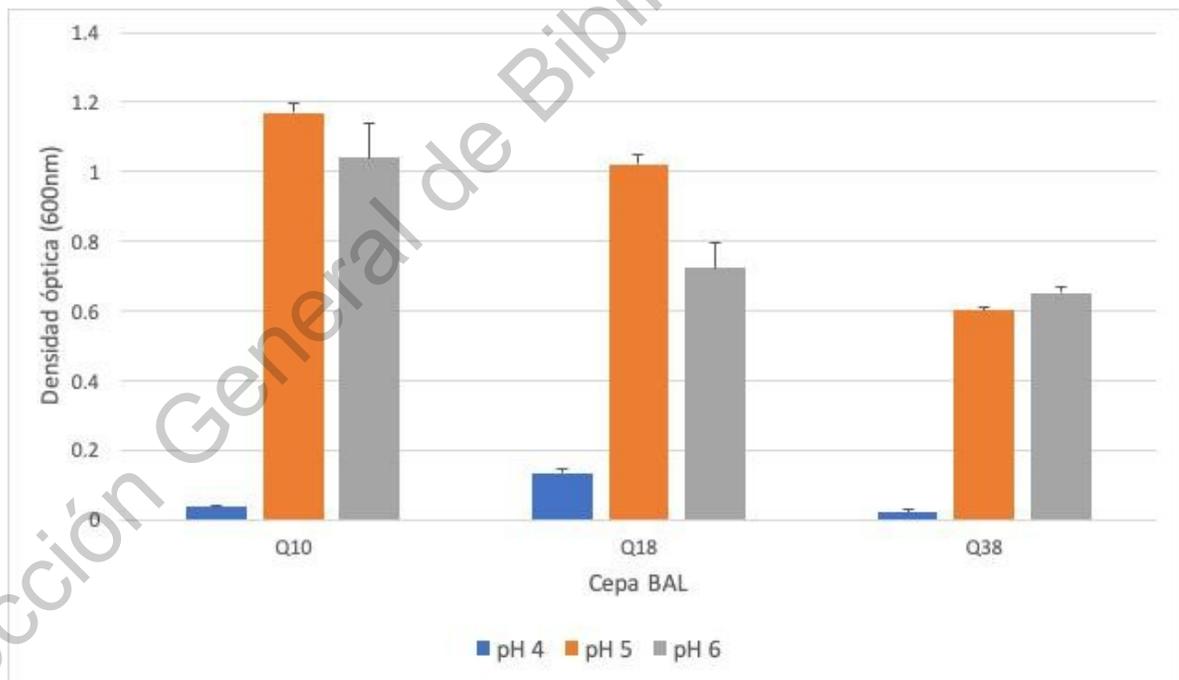


Figura 15. Desarrollo de BAL aisladas a partir de quesos madurados en CMRS ajustado a diferentes niveles de pH.

El gráfico representa la media de tres repeticiones de la DO alcanzada a 600nm, las barras de dispersión representan el error estándar.

Como ya se mencionó, los factores y niveles se evaluaron de forma independiente en cada una de las cepas seleccionadas, esto tomando en cuenta que las condiciones adversas del medio inducen la producción de moléculas conocidas como proteínas de estrés (Elizondo, 2014), las cuales confieren la resistencia y adaptación de las bacterias. Sin embargo, cada tipo de resistencia se ve inducida por la expresión de un gen específico, como es el caso del gen ATR (respuesta de tolerancia al ácido por sus siglas en inglés), el cual se ha visto expresado en BAL cuando las células bacterianas son expuestas a concentraciones subletales de ácido láctico (Ahmed *et al.*, 2003). Así como el gen ATR, existe un gen específico que al expresarse permite la adaptación de acuerdo al estrés presente en el medio, por ello se evaluó de forma independiente el desarrollo de las cepas ante cada uno de los factores de estrés estudiados, pues si el desarrollo de alguna cepa se veía limitado por la presencia de un factor de estrés, esta cepa no podría desarrollarse ante el conjunto de varios factores de estrés, por lo cual la cepa no sería útil para los efectos del presente estudio.

6.2.3 Efecto del pH y el contenido de etanol en la tolerancia a estrés por BAL aisladas de cerveza

Una vez seleccionadas las siete cepas con mayor capacidad de desarrollo en las pruebas unifactoriales, se procedió a evaluar su desarrollo bajo el efecto de los dos factores estudiados (pH y porcentaje de etanol) de forma simultánea. Se debe recordar que las bebidas fermentadas limitan o de cierta forma seleccionan el desarrollo de microorganismos, los cuales son seleccionados por la tolerancia natural a condiciones que regularmente limitan el desarrollo de las BAL, como lo son pH, concentraciones elevadas de etanol y escasez de nutrientes (Zapparoli *et al.*, 2006). Para ello, CMRS se ajustó a las condiciones de contenido de etanol y niveles de pH correspondientes a cada uno de los tratamientos mostrados en la Figura 16, esto con la finalidad de simular las condiciones presentes en el alimento;

una vez inoculadas las cepas, las suspensiones se incubaron (30°C/48 h) y se determinó la población máxima alcanzada mediante DO a 600 nm (Figura 16).

Las 7 cepas evaluadas mostraron muy baja capacidad de desarrollo en los tratamientos que involucraban un pH de 4 en presencia de cualquier concentración de etanol donde el máximo nivel de la DO_{600nm} alcanzado fue de 0.067 (Figura 16). En contraste, el mayor desarrollo por parte de las diversas cepas de BAL se encontró en los tratamientos con pH 6, donde el máximo promedio de DO_{600nm} fue igual a 0.571 en el tratamiento con 4% de etanol. Como se puede observar en la Figura 16, seguido al desarrollo a pH 6 se encontraron aquellos tratamientos con pH 5 donde el promedio máximo alcanzado fue muy cercano al obtenido a pH 6 (0.562); sin embargo, la diferencia radica en los mínimos, pues mientras el promedio mínimo a pH 6 fue de 0.539 para los tratamientos con pH 5 fue de sólo 0.432, lo cual indica que el desarrollo fue medianamente más pobre en los tratamientos con este último nivel de pH.

Otro dato importante de mencionares que tal como puede observarse en la Figura 16, las cepas pertenecientes a la especie *O. oeni* (7C, 9C) fueron las que mostraron mayor capacidad para desarrollar en la mayoría de los tratamientos empleados, claro ejemplo de ello es el caso de la cepa 7C que logró desarrollar aún en los tratamientos que presentaban pH 4, y en el tratamiento de 4% etanol y pH 5 fue la cepa que mostró una mayor capacidad de desarrollo.

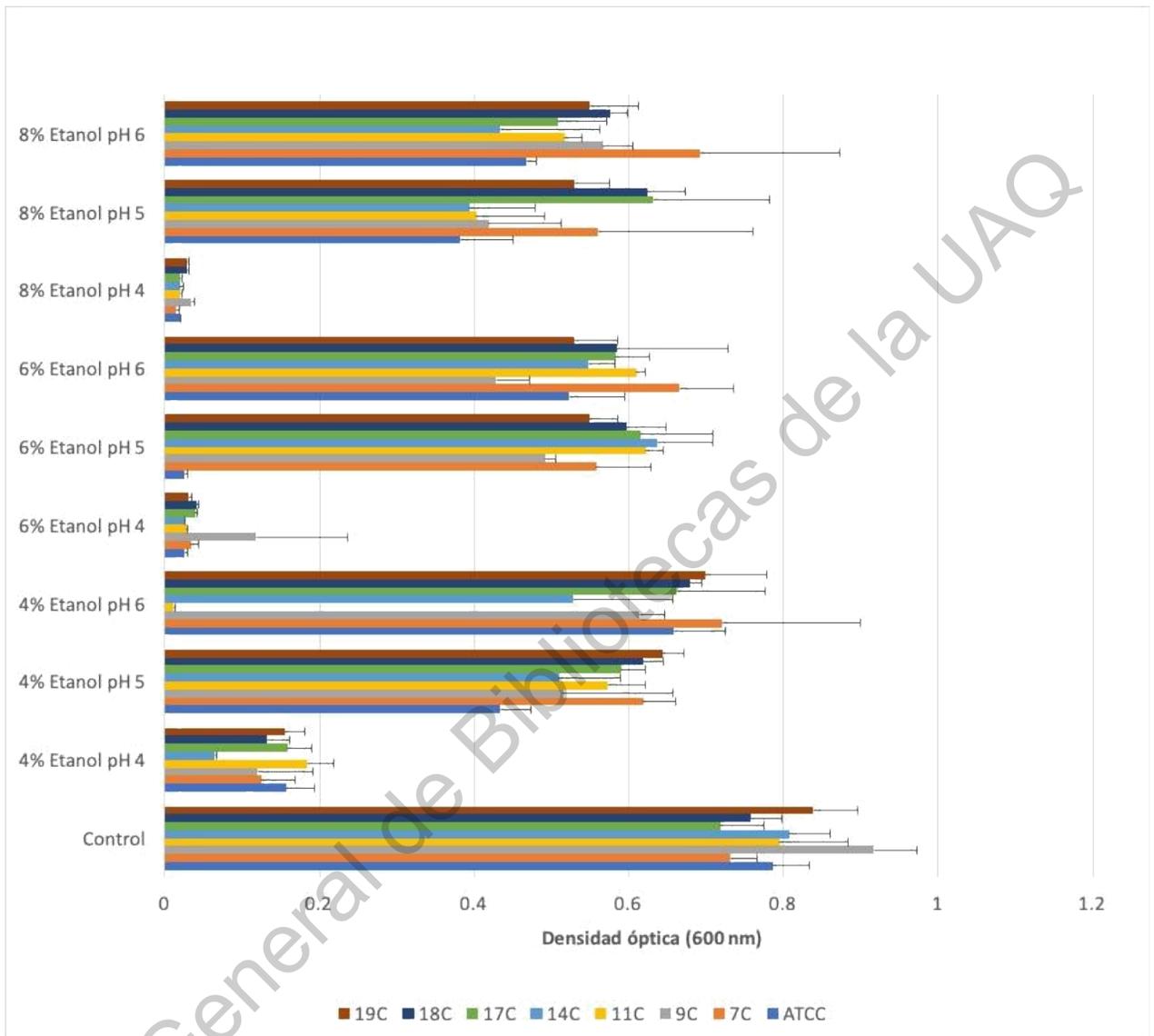


Figura 16. Desarrollo de BAL aisladas a partir de cerveza en CMRS ajustado a diferentes niveles de pH y distintas concentraciones de etanol.

El gráfico representa la media de tres repeticiones de la DO final (600nm) alcanzada a 30 °C/48h, las barras de error representan el error estándar.

Con base a los resultados obtenidos, se procedió a seleccionar tres cepas y tres tratamientos en los cuales se probaría la producción de AB en pruebas posteriores. La selección de los tratamientos se llevó a cabo considerando 3 niveles

distintos de desarrollo observados: bajo, medio y alto, donde los tratamientos elegidos fueron 4% etanol pH 4, 6% etanol pH 5 y 4% etanol pH 5 respectivamente. Es importante mencionar que a pesar de que algunas cepas mostraron mayor desarrollo en los tratamientos con un pH 6, no se seleccionaron debido a que en otras investigaciones se encontró que la producción de AB se ve favorecida en pH por debajo del óptimo, y el presente trabajo se centra en la producción de dichos metabolitos.

Por otro lado, se seleccionaron las 3 cepas que mostraron un comportamiento similar en los tres tratamientos elegidos y además su comportamiento fue reproducible en todas las pruebas efectuadas, tales cepas fueron 7C, 18C y 19C.

6.2.4 Efecto del pH y el contenido de NaCl en la tolerancia a estrés por BAL aisladas de quesos madurados.

Las pruebas bifactoriales para el caso de las cepas aisladas a partir de quesos madurados se realizaron de forma similar al método usado en las BAL provenientes de cerveza, variando en este caso a) el nivel de pH y b) el contenido de NaCl, los cuales se aplicaron de forma simultánea y resultaron en nueve tratamientos diferentes (Figura 17) aplicados a los tres aislamientos y a la cepa de referencia de producción de histamina (ATCC 33222).

Las cepas estudiadas fueron capaces de desarrollarse en la mayoría de las condiciones y en algunos casos mostraron niveles de DO superiores a los valores alcanzados por las cepas aisladas de cerveza. Por ejemplo, el promedio alcanzado de OD_{600nm} en los tratamientos de cerveza con pH=4 fue de 0.067 mientras las cepas Q10, Q18 y Q38 en los tratamientos con el mismo pH alcanzaron un Máximo de 0.384 OD_{600nm} , esto podría estar relacionado a que solutos como el NaCl, que puede promover la expresión de genes de respuesta a estrés, que son independientes del pH. La adaptación fisiológica le permitió a las cepas una mayor y más rápida adaptación al medio (Zaho y Kang, 2013).

Al igual que en las cepas aisladas a partir de cerveza, en los gráficos obtenidos (Figura 17) se observa que el pH es el factor más determinante. Para el desarrollo de las BAL, en el caso de la concentración de NaCl los resultados son muy variables dentro de cada nivel. El pH 5.0 fue el nivel más favorable para el desarrollo de las diferentes cepas de BAL, pues el promedio alcanzado en este nivel de pH fue de 0.743 DO_{600nm} , que es mucho mayor a comparación de los niveles de densidad óptica obtenidos a pH 4 y pH 6 que fueron de 0.384 y 0.646 respectivamente, para el caso del tratamiento con el pH mencionado y 2% de NaCl la máxima concentración alcanzada fué 0.83 DO_{600nm} , lo cual tiene sentido al representar el menor estrés a causa de solutos en el medio y así favorecer una rápida adaptación y desarrollo en el medio bajo estas condiciones.

Por último, los tratamientos con pH 6, fueron los que obtuvieron un desarrollo intermedio, donde el promedio máximo alcanzado en estos tres tratamientos fue de 0.646 DO_{600nm} , lo cual es mayor en comparación con lo alcanzado en el experimento en cepas de cerveza (0.562 DO_{600nm}). Para estos tratamientos, el máximo desarrollo se alcanzado fue en el pH indicado con 3% de NaCl donde la DO_{600nm} fue igual a 0.748.

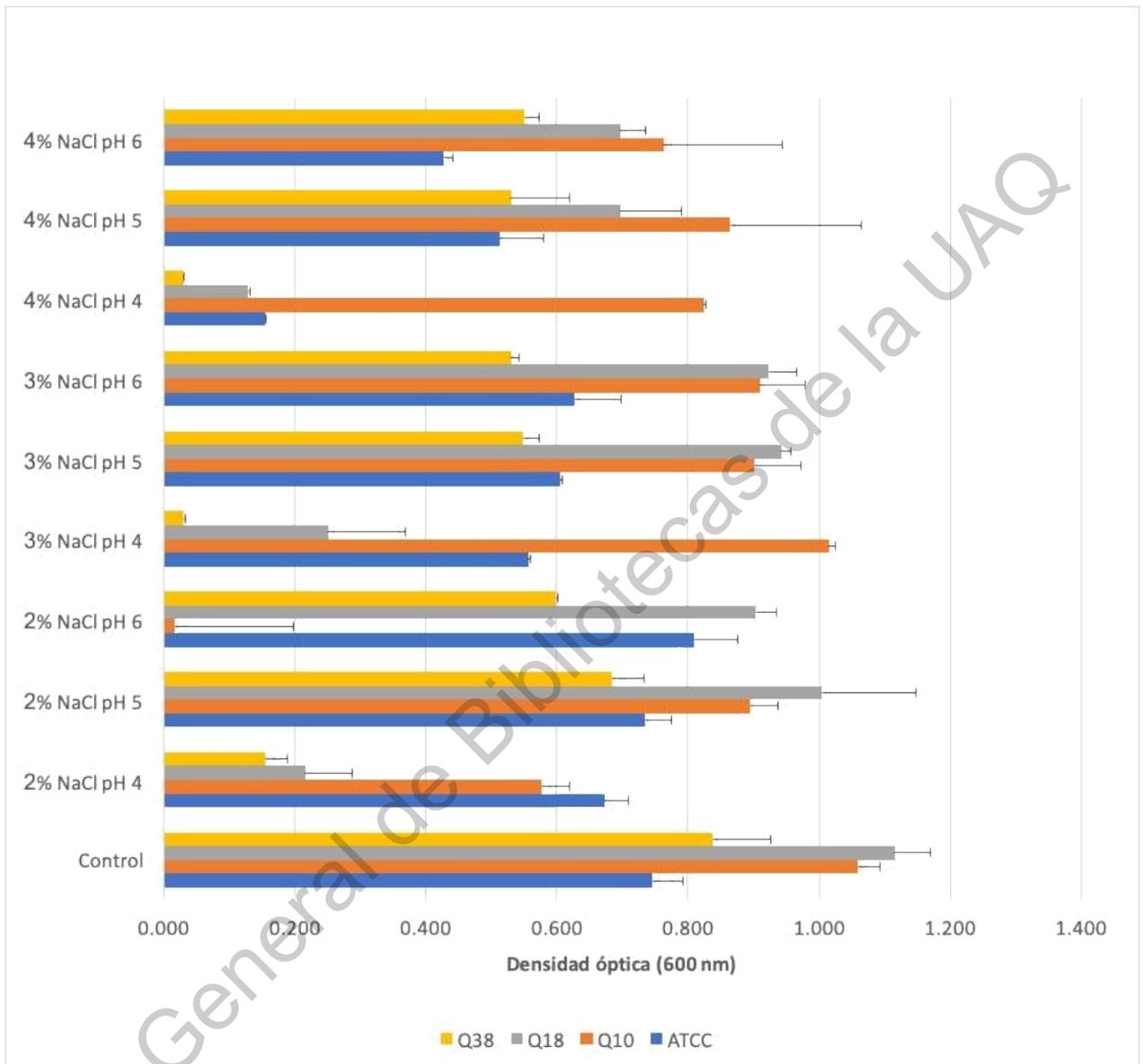


Figura 17. Desarrollo de BAL aisladas a partir de queso en CMRS ajustado a diferentes niveles de pH y distintas concentraciones de NaCl.

El gráfico representa la media de tres repeticiones de la DO a 600nm, las barras representan el error estándar.

Como ya se mencionaba, las cepas mostraron distintos niveles de desarrollo ante cada uno de los tratamientos, por lo cual, al igual que en los tratamientos aplicados a las cepas de cerveza fue necesario elegir tres condiciones para ser

usadas en pruebas posteriores para evaluar la producción de AB. Los parámetros tomados en cuenta para su selección fueron los mismos que para los tratamientos aplicados en BAL provenientes de cerveza. Los tratamientos elegidos para pruebas posteriores fueron 2% NaCl y pH 4 como tratamiento con desarrollo bajo, 4% NaCl y pH 5 como desarrollo medio, y finalmente como tratamiento con desarrollo alto se seleccionó aquel con 2% NaCl y pH 5. Para el caso de las cepas no fue necesario realizar una selección como en el caso de aquellas aisladas a partir de cerveza, pues recordemos que a partir de queso solo fue posible aislar tres cepas con capacidad genética para producir AB, por lo cual, los experimentos se continuaron únicamente con los mismos aislamientos más la cepa ATCC como referencia de producción de histamina.

En la Figura 17 podemos observar que a diferencia de las pruebas efectuadas en cepas de cerveza, la cepa correspondiente a *O. oeni* (Q38) fue la que presentó menor desarrollo a comparación de las cepas Q10 y Q18 pertenecientes a la especie *Lc. mesenteroides*, las cuales mostraron desarrollo favorable en un 70% de los tratamientos aplicados, por lo cual podría pensarse que a esta especie de BAL les produce más estrés el desarrollar en presencia alcohol y por el contrario les es más sencillo adaptarse a medios que contienen NaCl.

6.2.5 Evaluación de producción de AB por BAL bajo condiciones de estrés

Las aminas pueden provocar efectos tóxicos al ser ingeridas en altas concentraciones (Yisuf *et al.*, 2018). Por lo anterior, la determinación de AB contenidas en productos fermentados recientemente ha adquirido gran importancia como parámetro de calidad en alimentos fermentados (Mohammed *et al.*, 2016). La comunidad científica se ha enfocado en analizar los diferentes métodos empleados para la determinación de estos compuestos, donde la cromatografía líquida de alta eficiencia ha sido la técnica mediante la cual se han logrado obtener mejores resultados y por ello se ha vuelto la más comúnmente empleada para la detección y cuantificación de AB (Liu *et al.*, 2018).

Así pues, para determinar la producción de AB por parte de las BAL aisladas en el presente, se empleó CMRS suplementado con ornitina 2.5 g/L, debido a que el CMRS contiene los precursores de las AB estudiadas, con excepción de ornitina (precursor de putrescina). El caldo fue ajustado a 4% etanol pH 4, 6% etanol pH 5 y 4% etanol pH 5, para las cepas provenientes de cerveza; y 2% NaCl y pH 4, 4% NaCl y pH 5, 2%NaCl y pH 5, para las cepas aisladas de queso. Una vez inoculadas las cepas, a las 24 y 48 h se cuantificaron las AB haciendo uso de HPLC, la detección se llevó a cabo empleando la metodología establecida por (Smela *et al.*, 2003).

6.2.5.1 Producción de AB por parte BAL aisladas a partir de cerveza artesanal

Las cepas de BAL aisladas a partir de cerveza artesanal fueron capaces de producir AB en las condiciones evaluadas (Figura 18). Para el caso de histamina (Figura 18a) que es la AB de mayor toxicidad cuando se presenta en elevadas concentraciones, se pudo observar que las cuatro cepas evaluadas presentaron la capacidad de producir histamina bajo los tres diferentes tratamientos a partir de las 24 h; las concentraciones más altas de esta amina fueron alcanzadas a las 24 h por las cepas 7C y 18C presentando valores de 108 mg/L y 52 mg/L respectivamente en presencia de etanol al 4% y pH 4 (tratamiento 1), valores que superan el límite permitido para histamina en pescado de 50 mg/L (USFDA, 2002). Lo encontrado en la producción de histamina corresponde a lo encontrado por Farías (1993), donde mencionan que la presencia de ácidos como el láctico y málico favorecen la actividad de las enzimas descarboxilasas, y es precisamente en el tratamiento 1 con pH4 donde se encontraba la mayor concentración de ácido láctico, pues fue con este ácido que los CMRS se ajustaron al pH indicado. De igual forma, al realizar el análisis estadístico para la producción de histamina mostrado en la Tabla 11, encontramos que el tratamiento es que muestra y tiempo asumen significancia en la producción de esta amina, lo que es mayormente determinante para que se dé la producción es el tratamiento y en la Figura 19 podemos observar que el análisis estadístico apoya lo observado, pues bajo el tratamiento 1, las cuatro cepas

obtuvieron la mayor producción de histamina. Si contrastamos el tratamiento 2 (4% de etanol y pH 5) y 3 (6% de etanol y pH5), podemos observar el efecto de la presencia del etanol. Sólo en la cepa 7C se observó una diferencia, que podría estar asociada a un menor desarrollo de la cepa en presencia de 6% de etanol, pues bajo estas condiciones, en las pruebas bifactoriales efectuadas en microplaca, la cepa 7C alcanzó una densidad óptica de 0.618 para el tratamiento 2 y 0.558 para el tratamiento 3.

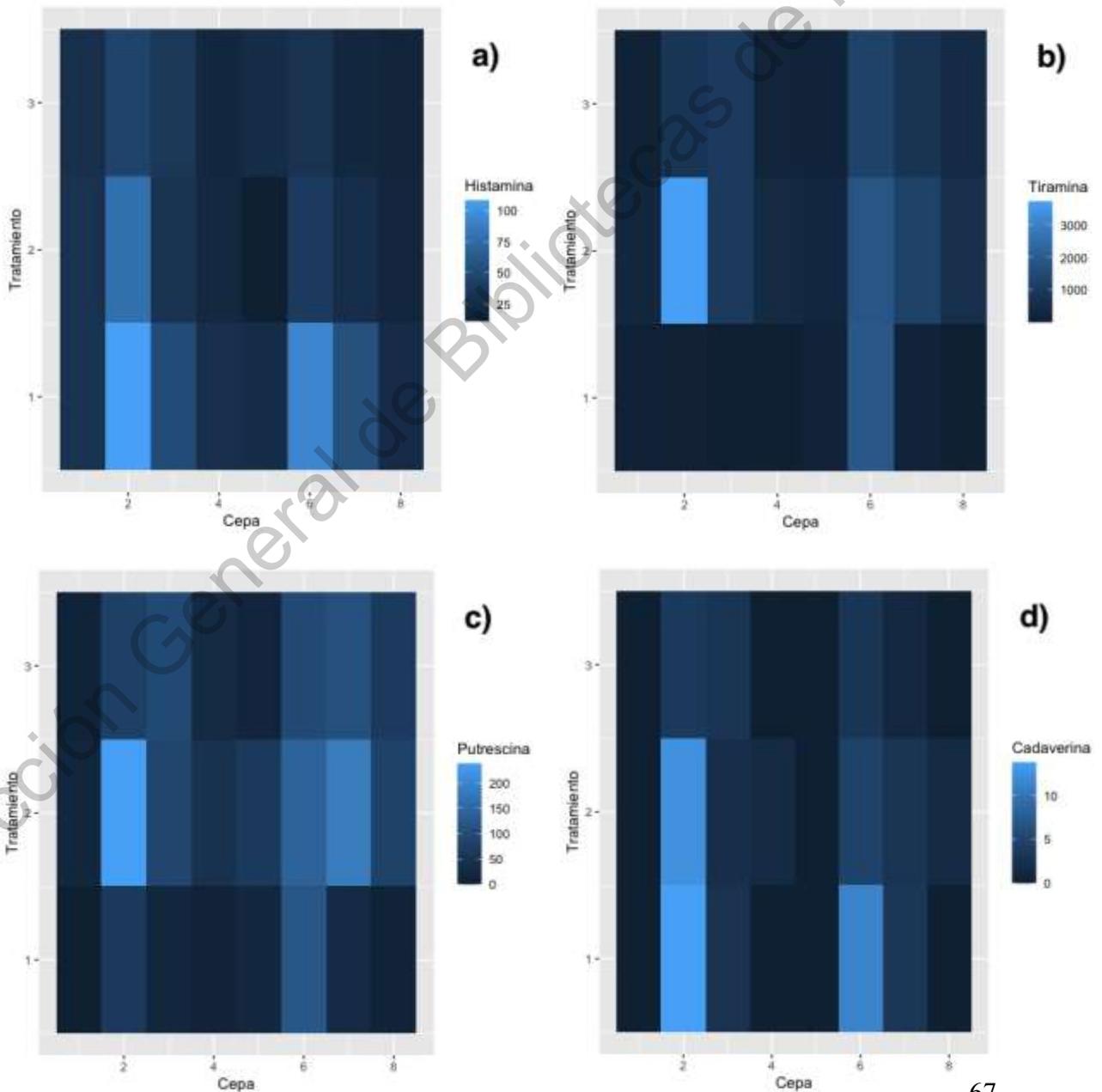


Figura 18. Mapa de calor de producción de AB (mg/L) por cepas de BAL aisladas a partir de cerveza bajo tres tratamientos diferentes.

Tratamiento: 1) etanol 4% pH 4, tratamiento 2) etanol 4% pH 5 y tratamiento 3) etanol 6% pH 5. Cepa: 1) ATCC 24h de incubación, 2) 7C 24h de incubación, 3) 18C 24h de incubación, 4) 19C 24h de incubación, 5) ATCC 48h de incubación, 6) 7C 48h de incubación, 7) 18C 48h de incubación, 8) 19C 48h de incubación. El color azul claro indica un mayor nivel de producción, mientras que el azul marino un mínimo.

Tabla 11. Valores de p obtenidos en el análisis de varianza para la producción de histamina por BAL aisladas de cerveza para los principales efectos y sus interacciones.

| Factor * | Valor P |
|------------------|------------|
| Cepa | 4.85e-05** |
| Tratamiento | 0.0013** |
| Cepa-Tratamiento | 0.03645* |

*Factor cepa corresponde a ATCC, 7C, 18C Y 19C.

Los valores de los tratamientos etanol 4% pH 4, etanol 4% pH 5 y etanol 6% pH 5..

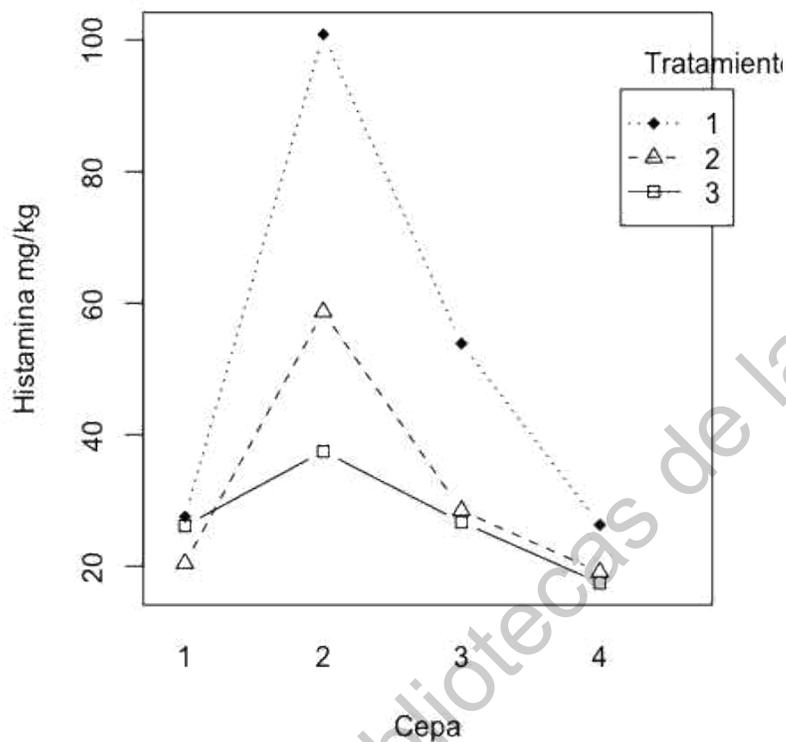


Figura 19. Interacción cepa-tratamiento en la producción de histamina por BAL aisladas de cerveza.

Las cepas son: 1) ATCC, 2) 7C, 3) 18C Y 4) 19C. Tratamientos: 1) etanol 4% - pH 4, 2) etanol 4% - pH 5 y 3) etanol 6% - pH 5.

Por otro lado, en la producción de tiramina, al igual que en el caso de histamina, todas las cepas estudiadas mostraron la capacidad de producirla, e incluso las concentraciones alcanzadas superaron de forma considerable los valores obtenidos de histamina (Figura 18b). Nuevamente la cepa 7C fue la que generó la mayor concentración, 3721 mg/l a las 24 h; sin embargo, es importante mencionar que ésta fue la única cepa que alcanzó la máxima concentración a las 24 h bajo el efecto del tratamiento 2 (etanol 4% pH 5), pues el resto alcanzaron el máximo al paso de 48 h, esto pudo deberse a que probablemente la curva de desarrollo para la cepa 7C ocurría en un periodo más corto que para el resto por lo cual la producción máxima de aminas se alcanzaba de manera prematura

comparado con los tiempos para el resto de cepas. Del Ríó *et al.* (2014) encontraron que algunas aminas se producen a partir de la fase de adaptación y durante la fase exponencial de las BAL, lo cual hace sentido, pues es aquí donde se da la activación de distintos mecanismos de adaptación para poder desarrollar en el medio. Seguido a la cepa 7C, encontramos la cepa 18C que al cabo de 48 h de incubación alcanzó valores de 1269 mg/l de igual forma bajo el tratamiento 2, pues como puede corroborarse en la Figura 20, el tratamiento 2 fue el que favoreció de mayor manera la producción de tiramina para las 4 distintas cepas. De igual forma, el análisis estadístico arrojó resultados donde tanto la cepa como el tratamiento son factores significativos estadísticamente para que se dé la producción de esta amina (Tabla 12), sin embargo, la interacción de ambos factores no resultó ser significativa. Nuevamente, el efecto del alcohol sobre la cepa 2 (7°C), con una menor producción en 6% de alcohol en contraste con 4% (Figura 20).

En la producción de putrescina se observó un comportamiento similar al de tiramina (Figura 18c), donde 7C alcanzó un máximo de 239 mg/L a las 24 h también bajo los efectos del tratamiento 2 (etanol 4%, pH 5), mientras el resto de cepas presentaron la máxima concentración al paso de 48 h, lo cual coincide con lo encontrado por Catalán (2013), donde la mayor producción de esta amina la encontraron en aquellos tratamientos con pH cercano a 5 que es el mismo nivel de pH al que pudimos obtener la mayor producción de putrescina, sin embargo, los niveles máximos detectados en el presente trabajo se encuentran muy distantes de lo encontrado por el grupo de trabajo citado, pues ellos obtuvieron un máximo de 18 mg/L, lo cual difiere mucho de lo encontrado en nuestros ensayos. Catalán (2013) menciona que lo limitante para que dentro de los tratamientos con este pH se diera la producción de la amina, fue la concentración del aminoácido libre precursor. En nuestro caso, el medio de cultivo fue suplementado con ornitina para evitar esa limitante.

Finalmente, cadaverina fue la amina producida en menor cantidad y no por todas las cepas estudiadas (ATCC no mostró capacidad de producción, Figura 18d), y nuevamente la cepa 7C produjo la mayor cantidad de cadaverina observada en el

experimento (14 mg/L), en esta ocasión ocurrió en presencia del tratamiento 1 (etanol 4% pH 4).

Tabla 12. Valores de p obtenidos en el análisis de varianza para la producción de tiramina por BAL aisladas de cerveza para los efectos principales y sus interacciones.

| Factor * | Valor P |
|------------------|------------|
| Cepa | 0.00334 ** |
| Tratamiento | 0.02540 * |
| Cepa-Tratamiento | 0.33830 NS |

*Factor cepa corresponde a ATCC, 7C, 18C Y 19C. Los valores de los tratamientos etanol 4% pH 4, etanol 4% pH 5 y etanol 6% pH 5. Los valores de tiempo son 24 y 48 horas de incubación.

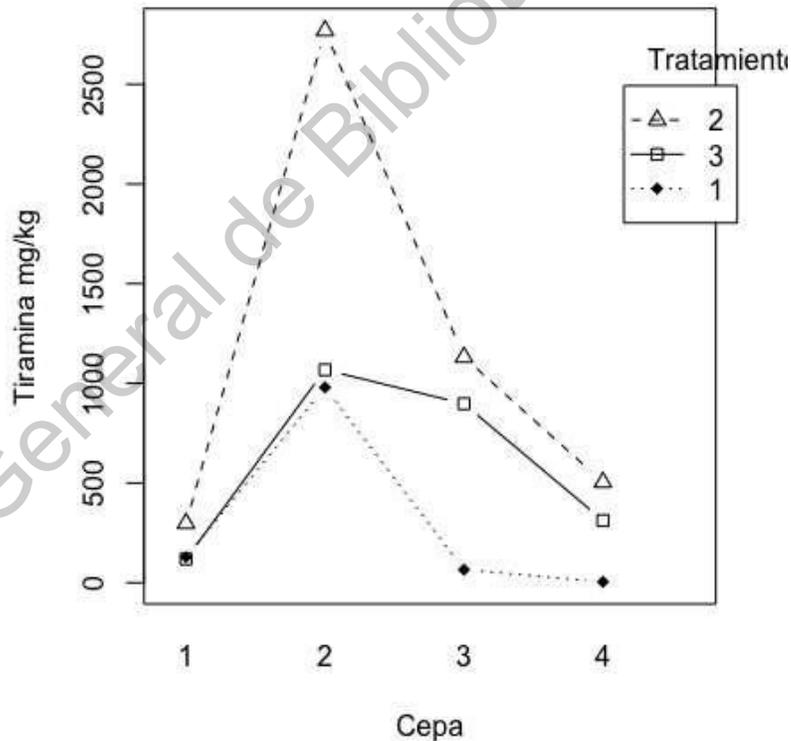


Figura 20. Gráfico de interacción cepa-tratamiento en la producción de tiramina por BAL aisladas de cerveza.

Las cepas son: ATCC, 7C, 18C Y 19C. Tratamientos: 1) etanol 4% - pH 4, 2) etanol 4% - pH 5 y 3) etanol 6% - pH 5.

Como la interacción no fue significativa podrías omitir esta gráfica, es opcional.

6.2.5.1 Producción de AB por parte BAL aisladas a partir de quesos madurados artesanales

El proceso de evaluación para producción de AB por parte de las cepas aisladas de quesos madurados artesanales se realizó empleando la misma estrategia experimental que en las cepas provenientes de cerveza, con la variante de que los factores a evaluar fueron pH y concentración de NaCl.

En relación a la producción de histamina, las cepas ATCC 33222 y Q10 obtuvieron la mayor producción, especialmente en el tratamiento 1 (NaCl 2% y pH 4), producción que fue alcanzada tras 24 h de incubación con 448 mg y 129 mg respectivamente (Figura 21a); estos valores se encuentran fuera del límite permisible establecido para histamina en pescado de 50 mg/L (USFDA, 2002), y coincide con lo encontrado por Catalán (2013). Landete (2005) encontró que el pH actúa sobre la actividad enzimática la cual tenía su máxima actividad a pH 8; sin embargo, Catalán (2013) y otros autores han reportado que la mayor producción de histamina se daba en pH con valores entre 4.0 - 4.8. Al ser histamina la única amina que produjeron las cuatro cepas estudiadas se procedió a realizar el ANOVA para identificar los factores más significativos en su producción (Tabla 13). Como era de esperarse la cepa es significativa, pues Moller *et al.* (2020) mencionan que existen factores determinantes para que se dé el aumento o disminución en la producción de AB, tales factores pueden ser la concentración de glucosa en el medio, de histidina e incluso los tiempos de incubación, e incluso el medio de cultivo, lo cual explica las diferencias en los niveles de producción de AB entre las cepas estudiadas, pues cada una de ellas posee requerimientos diferentes de cada uno de los factores mencionado, lo cual podría haber afectado directamente en la síntesis de AB. Sin embargo, dentro del análisis también podemos observar que el tratamiento es realmente significativo para que se dé la producción, y dentro de los tratamientos, es precisamente el tratamiento 1 donde se observa que se favorece la producción de histamina para todas las cepas (Figura 22). La interacción cepa-

tratamiento en este caso también resultó significativo, lo cual se puede apreciar claramente en la Figura 22. El efecto del tratamiento es diferente en cada cepa, en este caso, la cepa 1 (cepa ATCC) fue la que mostró un comportamiento diferente a las aisladas de queso.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

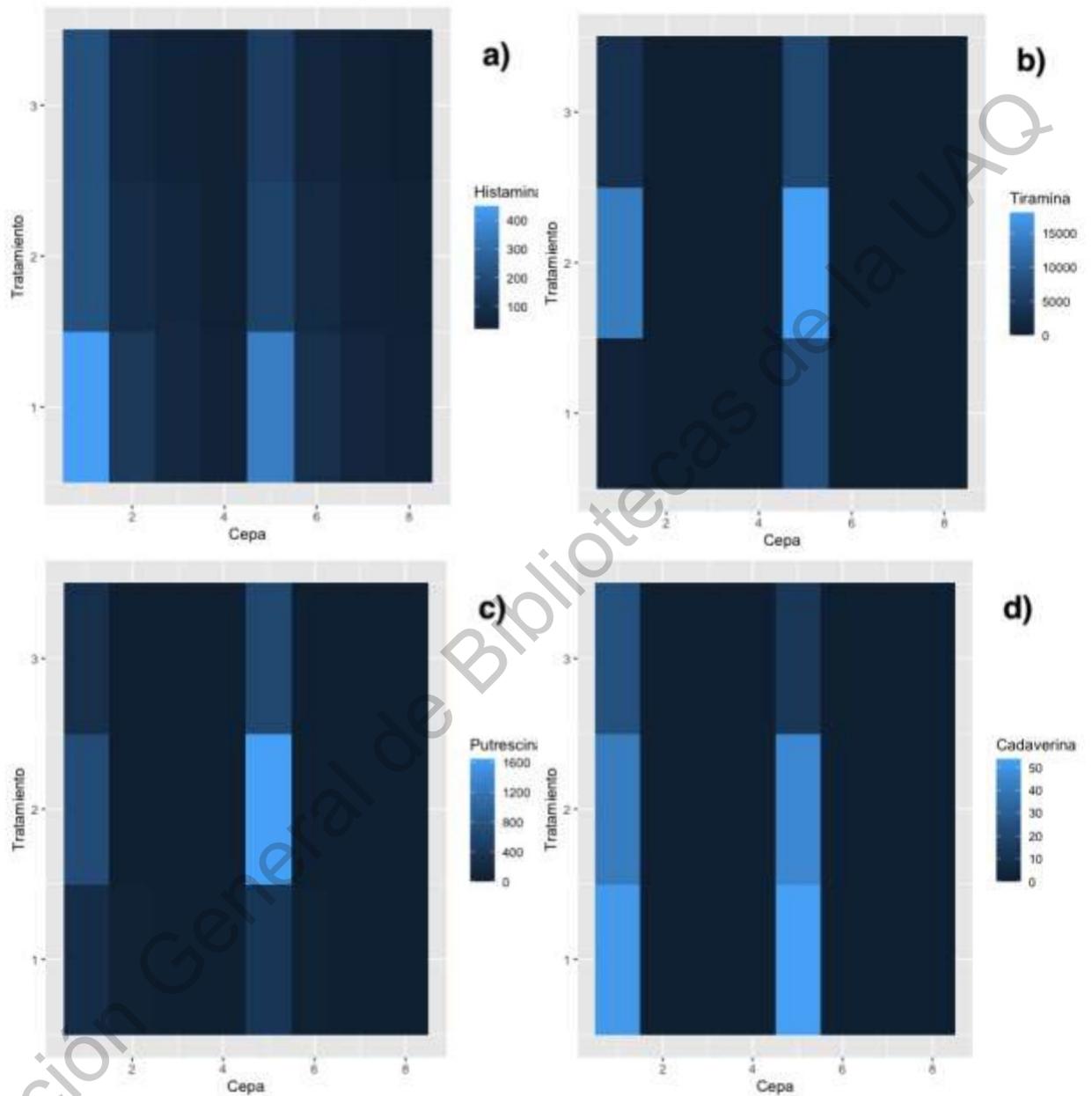


Figura 21. Mapa de calor de producción de AB (mg/L) por cepas de BAL aisladas a partir de quesos madurados bajo tres tratamientos diferentes.

Tratamiento: 1) 2% NaCl pH 4, tratamiento 2) 2% NaCl pH 5 y tratamiento 3) 4% NaCl pH 5. Cepa: 1) ATCC a las 24h de incubación, 2) Q10 a las 24h de incubación, 3) Q18 a las 24h de incubación, 4) Q38 a las 24h de incubación, 5) ATCC a las 48h de incubación, 6) Q10 a las 48h de incubación, 7) Q18 a las 48h de incubación, 8) Q38 a las 48h de incubación. El color azul claro indica un mayor nivel de producción, mientras que el azul marino un mínimo.

Tabla 13. Valores de p obtenidos en el análisis de varianza para la producción de histamina por BAL aisladas a partir de quesos madurados para los principales efectos y sus interacciones.

| Factor* | Valor P |
|-------------------------|-------------|
| Cepa | 1.43e-05 ** |
| Tratamiento | 0.0264 * |
| Tiempo | 0.3321 NS |
| Cepa-Tratamiento | 0.0342 * |
| Cepa-Tiempo | 0.3578 NS |
| Tratamiento-Tiempo | 0.8704 NS |
| Cepa-Tratamiento-Tiempo | 0.8441 NS |

*Factor cepa corresponde a ATCC, Q10, Q18 y Q38. Los valores de los tratamientos son 2% NaCl pH 4, 2% NaCl pH 5 y 4% NaCl pH 5. Los valores de tiempo son 24 y 48 horas de incubación.

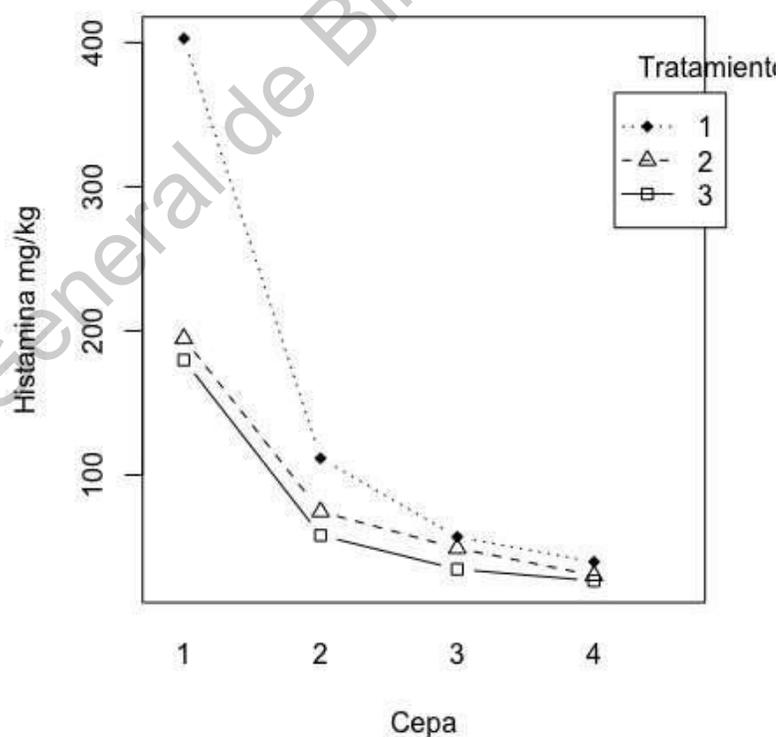


Figura 22. Gráfico de interacción cepa-tratamiento en la producción de histamina por BAL aisladas de quesos madurados.

Las cepas son: 1) ATCC, 2)7C, 3)18C y 4)19C. Tratamientos: son 1) NaCl 2% - pH 4, 2) NaCl 2% - pH 5 y 3) NaCl 4% - pH 5.

Por otro lado, para el caso de tiramina solo la cepa de referencia ATCC 33222 mostró capacidad de producirla bajo los tres diferentes tratamientos. Bajo el tratamiento 2 (2% NaCl pH 5) se alcanzó la máxima concentración (18019 mg/L) tras 48 h de incubación; La cepa Q10 mostró capacidad de producir tiramina solamente en este mismo tratamiento, aunque lo hizo en cantidades muy bajas (8 mg/L a las 48 h): Las concentraciones producidas por la cepa ATCC son alarmantes, pues aunque no existe un límite establecido para esta amina, estudios recientes mencionan que concentraciones entre 600 y 2000 mg/L pueden causar alteraciones en la presión sanguínea (Benkerroum, 2016), además de potencializar la acción de histamina. Algo que es importante de resaltar es que, König *et al.* (2009) mencionan que generalmente esta amina no es producida por BAL, sin embargo, algunas cepas de *Lactobacillus hilgardii* poseen capacidad de producirla (Landete *et al.*, 2006). En el caso de las cepas productoras de esta amina aisladas en el presente trabajo tanto de cerveza, como de queso pertenecen a las especies *O. oeni* y *Lc. mesenteroides*, por lo cual este trabajo aporta el conocimiento de que estas especies pueden llegar a presentar la capacidad de producción de tiramina, además de histamina.

En el caso de putrescina, al igual que para tiramina, sólo la cepa ATCC mostró capacidad de producirla en los tres escenarios evaluados, generando la máxima producción (1641 mg/L a las 48h) en el tratamiento 2 (2 % NaCl pH 5); bajo este mismo tratamiento la cepa Q10 pudo producir putrescina (24 mg/L a las 48h). Estos resultados coinciden con lo reportado por Del Río *et al.* (2014), quienes señalan que valores de pH por debajo de 5.5 favorecen la producción de putrescina.

Finalmente, en el caso de cadaverina únicamente ATCC presentó producción de esta amina, siendo el tratamiento 1 (4% etanol pH 4) donde alcanzó su máxima concentración tras 48 h de incubación siendo 54 mg/L la cantidad detectada.

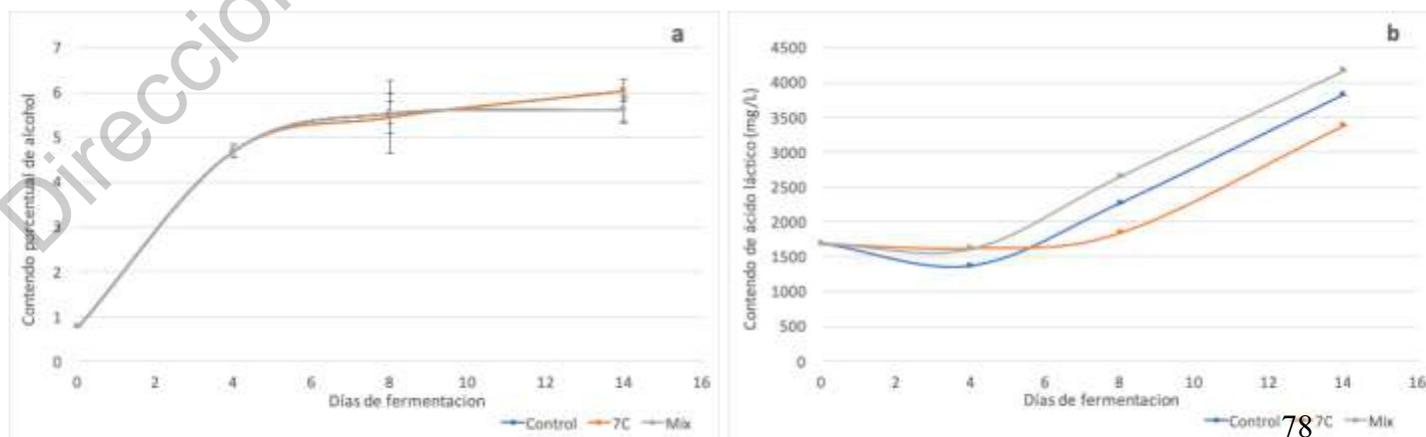
Como podemos observar, El factor más relevante para la producción de las aminas fue el nivel de pH ya que su producción se ve favorecidas según este factor. Así pues, de forma general podemos definir que a pH 4 se favorece la producción de las aminas histamina y cadaverina, mientras a pH 5 aumenta la síntesis de tiramina y putrescina. Otra cosa importante a mencionar es que las cantidades máximas alcanzadas a las 24 h generalmente mostraron una disminución al cabo de 48 h, esto pudo deberse a que algunos autores mencionan que las aminas pueden degradarse por acción residual de enzimas oxidasas (Dapkevicius *et al.*, 2000; Voigt, 1978), lo cual explicaría la significativa reducción en algunos casos.

6.3 Cinética de BAL, parámetros físicos y químicos durante la fermentación alcohólica de mosto de cebada.

Las cervezas elaboradas de forma artesanal han adquirido una gran importancia y con ello un incremento en su consumo por parte de aquellos que buscan cervezas diferentes y con características especiales (Chan *et al.*, 2019). Generalmente, esta bebida es considerada como segura, debido a la reducida disponibilidad de nutrientes, bajo nivel de oxígeno, al bajo nivel de pH, y la presencia de alcohol, ácidos y lupulina, que dificultan el crecimiento de una gran mayoría de bacterias (Fraunhofer *et al.*, 2018). A pesar de ello, bacterias como las BAL pueden llegar a estar presentes en este tipo de ambientes y provocar deterioro del producto, o peor aún, producir AB en la matriz alimentaria. Existen reportes donde en producto terminado se han logrado recuperar hasta 1×10^4 UFC/mL de BAL, e incluso en el proceso de fermentación se han contabilizado 1×10^6 UFC/mL de BAL en los tanques de fermentación (Sossa *et al.*, 2009). Por ello, en el presente trabajo se realizó una cinética para observar la persistencia de BAL durante el proceso de fermentación del mosto de cerveza, intentando simular las condiciones de producción para cerveza artesanal. Además, se monitorearon los cambios en parámetros físicos y químicos, para evaluar la posibilidad que bajo las condiciones observadas durante

el proceso de fermentación se diera la producción de AB por parte de las BAL. Para ello el mosto de cebada fue inoculado con BAL previamente aisladas y caracterizadas como productoras de AB. Se emplearon dos inóculos diferentes, el primero únicamente contenía a la cepa 7C (*O. oeni*) pues recordemos esta cepa mostró ser la cepa con mayor capacidad de producción de AB en pruebas previas, mientras el segundo inóculo estuvo conformado por las 3 cepas estudiadas en la producción de AB las cuales fueron 7C, 18C y 19C (2 cepas *O. oeni*, 1 cepa desconocida). Todas las cepas empleadas en esta prueba, fueron cepas mutantes a las cuales se les generó resistencia a 150 ppm de rifampicina, con la finalidad de diferenciar el inóculo de las BAL que pudieran estar presentes de forma natural en la matriz alimentaria.

Como podemos observar en la Figura 23, el contenido de etanol fue incrementando a lo largo de la fermentación y los azúcares reductores presentes en el medio fueron disminuyendo (Figura 23c). Se observó un comportamiento de estos parámetros como se esperaba, dado que, en la fermentación alcohólica, se presenta la degradación de azúcares en alcohol por medio del metabolismo de las levaduras empleadas en el proceso (Vazquez y Dacosta, 2007). Al finalizar el proceso fermentativo los azúcares se encontraron en concentraciones alrededor de 260 mg/L en comparación con los 10714 mg/L iniciales. En la Figura 23b, se observa un incremento en la producción de ácido láctico, lo cual podría estar asociada a la actividad de las BAL y que afectó directamente a los niveles de pH encontrados en el mismo medio estudiado (Figura 23d).



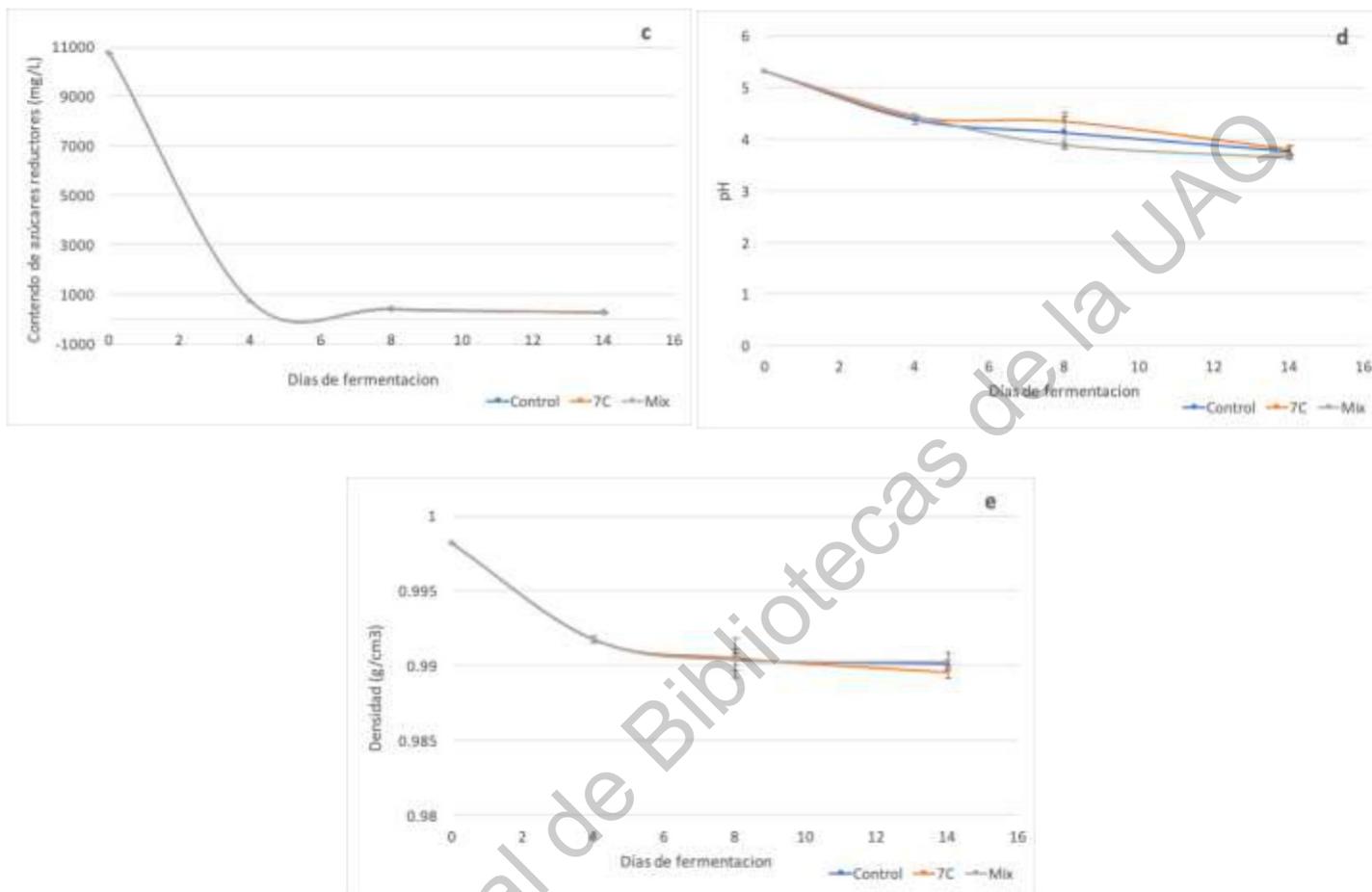


Figura 23. Gráfico de cinéticas de parámetros físicos y químicos a lo largo de la fermentación alcohólica de mosto de cebada inoculado con BAL productoras de AB.

a) contenido de etanol; b) ácido láctico; c) contenido de azúcares reductores; d) pH; e) densidad. Las barras representan el error estándar de las tres repeticiones realizadas.

Así pues, al observar el gráfico, podemos apreciar que el contenido de etanol logró alcanzar hasta 6% de etanol, lo cual es un nivel bastante alto considerando que Sossa *et al.* (2009), mencionan que en un ambiente fermentativo donde se encuentran presentes levaduras y BAL, el rendimiento en producción de etanol

puede verse afectado por la producción de ácido láctico, ya que, por cada molécula de ácido láctico producida, se pierden dos moléculas de etanol. Las concentraciones de ácido láctico obtenidas al final de la fermentación fueron entre 3383-4163 mg/L.

Por otro lado, los niveles de pH al término de la fermentación alcohólica oscilaron sobre 3.6 y 3.8, valores que coinciden con los niveles de pH encontrados en cervezas por Poveda (2019). Para el caso de la Figura 23e, se observa que la densidad final de la cerveza estuvo alrededor de 0.99 g/cm^3 , lo cual se encuentra muy cercano a los niveles de densidad encontrados en varias cervezas por Suárez (2003), donde la densidad de las cervezas estudiadas osciló en 1 g/cm^3 . Por ello y con base en los niveles de densidad obtenidos, se deduce que la fermentación llevada a cabo en el presente trabajo se culminó de forma correcta.

En la Figura 24 se muestra la evolución de las poblaciones de BAL durante los 14 días que se llevó a cabo la fermentación alcohólica del mosto de cebada. Al inicio del proceso el mosto contaba con un inóculo entre 5 y 6 logaritmos de UFC/mL de la mezcla de BAL y de la cepa 7C, según correspondía. Debido a las condiciones estresantes del medio las poblaciones fueron disminuyendo hasta el final de la fermentación donde se logró recuperar alrededor de 1.6 y 1,7 Log de UFC/mL de población para cada uno de los 2 inóculos de BAL empleados (Cepa 7C y mezcla de BAL) para la dinámica de sobrevivencia en el proceso de fermentación del mosto.

Las concentraciones de BAL encontradas en este trabajo, se encuentran por debajo de lo reportado en cerveza por otros autores, 4 logaritmos de UFC/mL (Sossa *et al.*, 2009) y 6 logaritmos de UFC/mL (García, 2012). Sin embargo, algo importante de resaltar es que al menos 1.5 Log de población de BAL permanecieron viables hasta el final del proceso fermentativo; además, en el caso del inóculo formado por una mezcla de tres cepas, se observa que del día dos al cuatro, el descenso de población no fue significativo, sino que se observa una fase estacionaria, por lo cual las células bacterianas en este periodo pudieron encontrarse en adaptación al medio. Así pues, observando la sobrevivencia y la etapa de adaptación por parte de la mezcla de BAL, no resulta difícil creer que pudo

darse la producción de AB durante la fermentación del mosto al encontrarse presentes varios factores de estrés y las cepas haber generado cierto grado de adaptación.

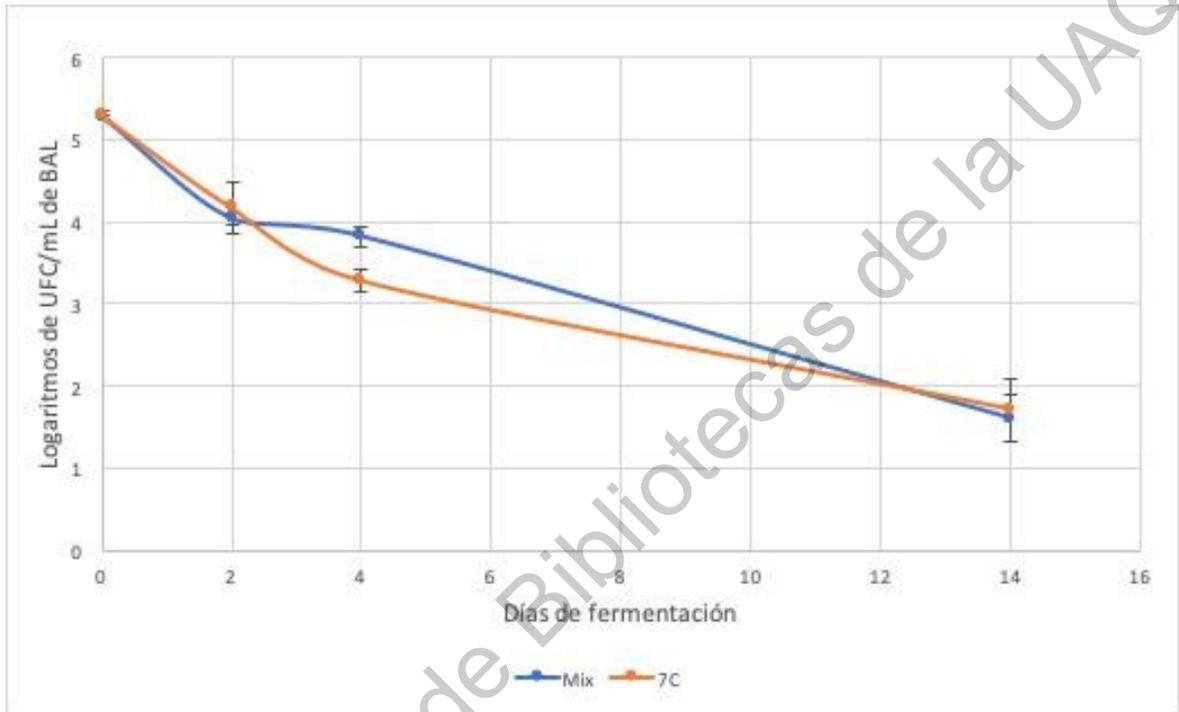


Figura 24. Gráfico de supervivencia de BAL durante el proceso de fermentación alcohólica de mosto de cebada para el proceso de elaboración de cerveza.

Mix representa la mezcla 3 cepas de BAL empleadas (7C, 18C, 19C). Las barras representan el error estándar de las tres repeticiones realizadas.

6.4 Evaluación de susceptibilidad de BAL productoras y no productoras de AB ante germicidas comúnmente empleados en la industria

Los alimentos elaborados de forma artesanal, recientemente han adquirido popularidad entre los consumidores (Diario de Gastronomía, 2018), por lo cual se ha visto un incremento significativo en su producción. Cuando se amplía la producción se hace necesario fortalecer la sanidad en el proceso de producción del alimento. Dentro de la sanidad en la producción de alimentos una acción básica es el saneamiento adecuado de superficies y utensilios, pues por medio de ella se puede evitar el aporte de diversos microorganismos que pueden ser patógenos o de deterioro. En el caso de los quesos madurados, la microbiota presente proviene de tres fuentes diferentes: cultivos iniciadores, cultivos adjuntos y microbiota contaminante (Pachlova *et al.*, 2018); dentro de las cuales pueden estar contenidas las BAL. Para el caso de cerveza, usualmente en su elaboración se emplea melaza de caña o maíz como materia prima, donde BAL pueden estar contenidas como microorganismos contaminantes (Sossa *et al.*, 2009), llegar a la cerveza y producir problemas de deterioro. Aunque las BAL son consideradas GRAS y en la industria la problemática asociada a ellas es por provocar deterioro en los productos, pueden tener la capacidad de producción de AB, por lo que si estos compuestos se encuentran presentes en el producto puede presentar afecciones al consumidor.

Por todo lo anterior, es de suma importancia evitar que BAL productoras de AB lleguen al producto, esto puede evitarse llevando a cabo un correcto saneamiento, donde los germicidas empleados en estos procesos juegan un papel importante. En la industria existen germicidas que han sido tradicionalmente usados como cloro, yodo, amonios cuaternarios, sus respectivos derivados, y más recientemente el ácido peracético (López *et al.*, 2002). Sin embargo, han aparecido algunas otras alternativas

como es el caso del agua electrolizada y los detergentes a base de compuestos de superoxidación. Algo importante de mencionar es que el estudio y validación para este tipo de germicidas se ha enfocado principalmente en la acción sobre microorganismos patógenos dejando a un lado a microorganismos de deterioro como es el caso de las BAL.

6.4.1 Evaluación de susceptibilidad a germicidas de BAL aisladas de alimentos.

Para llevar a cabo la evaluación de la acción germicida sobre BAL de cloro (200 ppm), ácido peracético (80 ppm), agua electrolizada (1:50) y SaniClean (1:50) (detergente de superoxidación), donde las concentraciones para cloro y ácido peracético se corroboraron como se describe en los anexos, mientras para el caso de SaniClean y agua electrolizada se tomó como referencia que el voltaje obtenido se encontrara dentro de los rangos establecidos por (Zang *et al.*; 2019). Posteriormente, se simuló las condiciones de células depositadas en superficies de acero inoxidable. Para ello se realizaron 4 mezclas distintas de cepas de BAL, dos mezclas de cepas provenientes de queso, una de ellas con 3 cepas productoras de AB (2 cepas *Lc. mesenteroides*, 1 cepa *O. Oeni*), una mezcla de tres cepas análogas de BAL no productoras de AB; y dos mezclas de cepas provenientes de cerveza: 3 cepas de BAL productoras de AB en mezcla (2 cepas *O. Oeni* y una cepa de identidad desconocida), y 3 cepas no productoras de AB (1 cepa *Lc. mesenteroides*, 1 *Lb. brevis*, una cepa identidad desconocida) también en mezcla. La susceptibilidad de cada una de las 4 mezclas se evaluó para los diferentes tratamientos, con la finalidad de poder observar si la capacidad de producción de AB se asocia a una susceptibilidad determinada de las cepas ante germicidas; esto bajo la premisa de que las AB son producidas por BAL en condiciones de estrés para reducir las condiciones estresantes del medio para así poder adaptarse y desarrollar (Gardini *et al.*, 2005).

Las cepas aisladas de cerveza presentaron diferencia significativa en la reducción de las poblaciones de BAL entre los germicidas aplicados (Figura 25). El agua

electrolizada (1:50) no mostró una aparente capacidad de inactivar a las BAL, pues la reducción obtenida se debió por el arrastre del líquido y no por el germicida en sí; caso contrario, el germicida que mostró una mayor eficacia fue el ácido peracético (80 ppm), el cual para cepas productoras de AB logró una reducción de 2.5 Log UFC/cm², y para cepas no productoras 2.1 Log UFC/cm², resultado que corresponde a lo encontrado por López *et al.* (2002), quienes reportan que los germicidas evaluados el ácido peracético presentó la mayor eficacia en reducciones logarítmicas de poblaciones microbianas, lo cual se le atribuye a que el ácido peracético además de ser un poderoso oxidante, oxida los grupos sulfhidrilos y grupos amino de las moléculas de aminoácidos. Por otro lado el cloro (ppm) en cepas productoras redujo 1.7 Log UFC/cm² y en no productoras, 2.4 LogUFC/cm², así pues, las reducciones efectuadas en BAL por el hipoclorito de sodio se encuentra muy lejanas de los datos de reducción de poblaciones de microorganismos patógenos, donde Fay *et al.* (1953) encontraron que el cloro a 200ppm lograba reducir en un 99.25% las poblaciones de *Escherichia coli*, mientras para el caso de *Staphylococcus aureus*, Boddy *et al.* (1998) observaron reducciones de hasta 65.6% en las poblaciones estudiadas. Finalmente, el detergente SaniClean en conjunto con el agua electrolizada mostró resultados un poco más favorables que el agua electrolizada por sí sola, pues el conjunto de germicidas secuenciales alcanzó reducciones de 1.2 y 1.5 logUFC/cm² para las cepas productoras y no productoras respectivamente. Sin embargo, no logra reducir los 5 Log que se requieren como ideal para una sustancia como sustancia con actividad germicida.

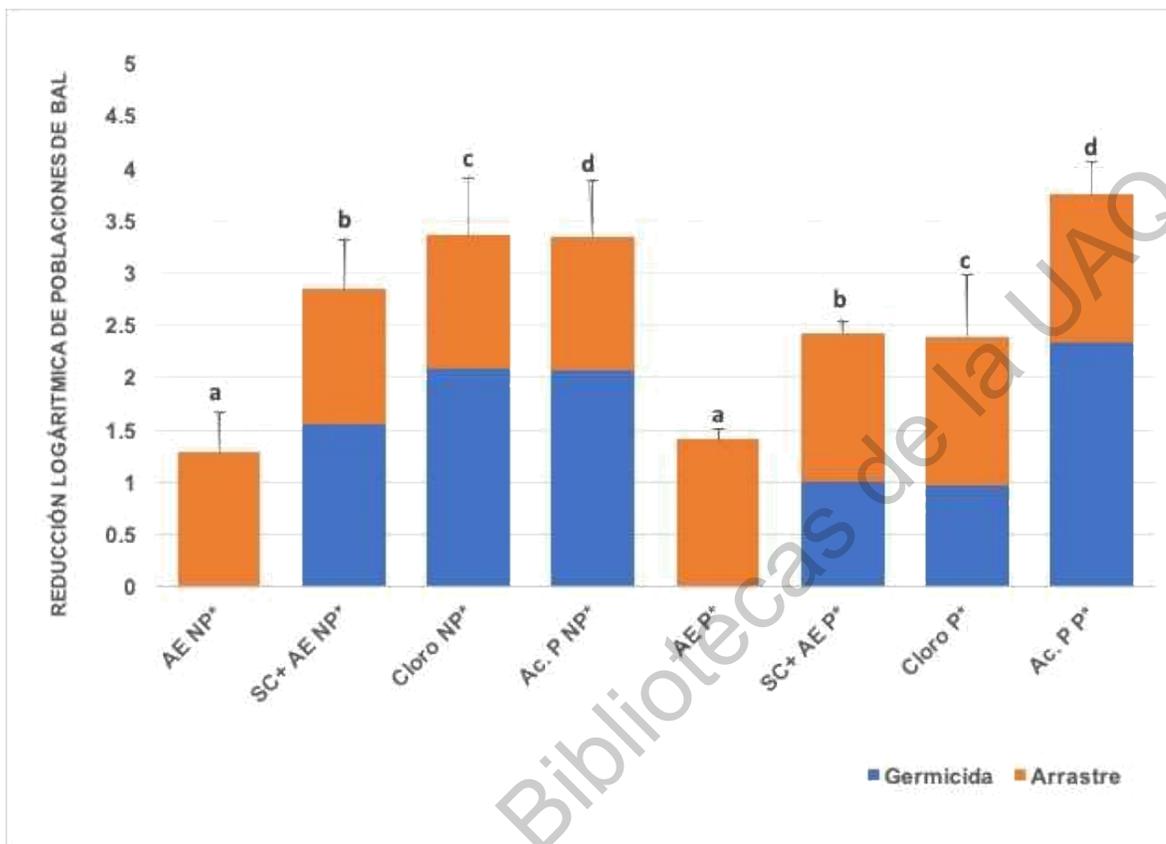


Figura 25. Reducción logarítmica de las poblaciones de BAL aisladas de cerveza por diversos germicidas.

NP*: Cepas no productoras de AB; P*: Cepas productoras de AB, ante SC+AE: SaniClean + agua electrolizada; Cloro: Hipoclorito de sodio; AE: Agua electrolizada y Ac.P: Ácido peracético. Las barras representan la media de tres mediciones y las barras de error la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencia significativa (Tukey, $\alpha=0.05$).

Con base a las reducciones obtenidas en el presente trabajo, podemos observar que se encuentran muy lejanas de las reducciones encontradas por otros autores para el caso de patógenos ante germicidas como el ácido peracético y cloro, lo cual podría estar asociado a que las cepas evaluadas generaron cierto tipo de resistencia hacia estos compuestos pues Luo *et al.* (2021) reportaron que existen

poblaciones de bacterias resistentes al cloro, las cuales pueden sobrevivir e incluso pueden volver a crecer después de la aplicación de cloro libre en el cloro residual. De igual forma, observamos que los resultados en la reducción de poblaciones microbianas por parte del detergente y el agua electrolizada no presentaron la eficacia esperada, pues en otras investigaciones como la de Zang *et al.* (2019) con el empleo de este compuesto químico lograron reducir hasta 8 Log para poblaciones *S. Enteritidis* y alrededor de 8.5 Log para poblaciones de *E. coli*.

Por otro lado, en el gráfico 26 se observan las reducciones obtenidas en las cepas de BAL aisladas a partir de quesos madurados; los patrones observados son muy similares a los observados en cepas provenientes de cerveza, pues de igual forma el agua electrolizada sólo mostró la reducción por el arrastre y el ácido peracético generó la mayor reducción en la población de cepas productoras de aminas biogénicas (2.6 Log UFC/cm²). Las reducciones efectuadas por el ácido peracético en el presente trabajo, coinciden con lo encontrado por Kataria *et al.* (2020), donde empleando concentraciones entre 50-500 ppm y colocando en inmersión durante 10-60 segundos lograron reducciones de 2 a 2.6 Log. En las cepas de BAL no productoras, la reducción observada por la aplicación de este germicida fue de 2.1 Log UFC/cm² y la aplicación del cloro logró 2.4 Log UFC/cm² de reducción, cifra que superó la reducción generada por ácido peracético, este resultado podría atribuirse a que el hipoclorito de sodio es un agente que reacciona con las paredes celulares ocasionando daños en la integridad de la célula, con lo cual se logra la inactivación de la misma (McDonell y Rusell, 1999). La inactivación observada cuando se aplicó el detergente SaniClean y posteriormente el agua electrolizada fueron similares en los dos grupos de BAL (productoras y no productoras de AB), obteniendo niveles de reducción de alrededor de 1.5 LogUFC/cm².

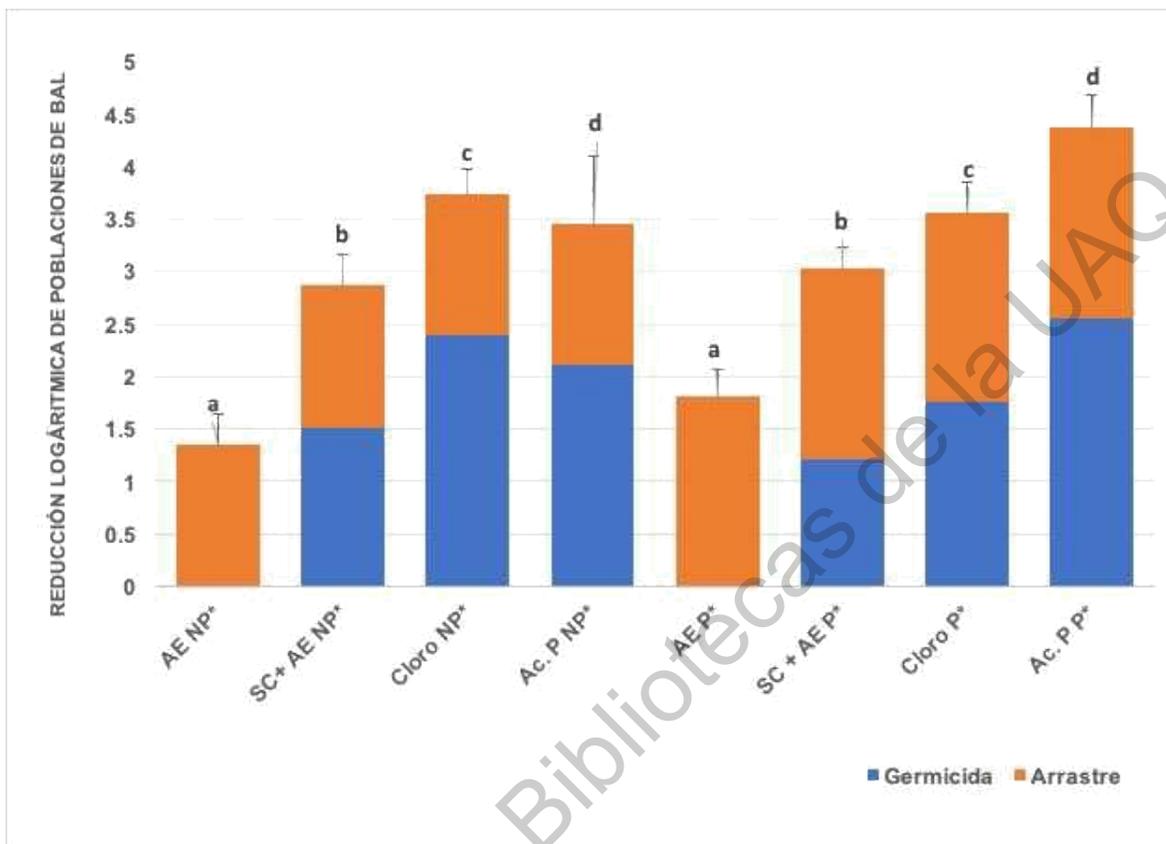


Figura 26. Reducción logarítmica de las poblaciones de BAL aisladas a partir de quesos por diversos germicidas.

NP*: Cepas no productoras de AB; P*: Cepas productoras de AB, ante SC+AE: SaniClean + agua electrolizada; Cloro: Hipoclorito de sodio; AE: Agua electrolizada y Ac.P: Ácido peracético . Las barras representan la media de tres mediciones y las barras de error la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencia significativa (Tukey, $\alpha=0.05$).

Al realizar un análisis de varianza con la finalidad de identificar si la tolerancia ante los germicidas es diferente entre cepas productoras de AB y las no productoras evaluadas en el presente trabajo. Dicho análisis estadístico mostró que el germicida es un factor determinante para la reducción de poblaciones.

Así mismo, al realizar la prueba de Tukey con una significancia de 0.05, el estadístico arrojó que todos los tratamientos tienen un efecto significativamente diferente entre ellos.

Aunque la capacidad para producir AB como factor principal, no parece relevante, en las interacciones dobles de factores, encontramos que la interacción más significativa es entre el grupo de BAL (productoras/no productoras de AB) y el germicida empleado (Tabla 14). Lo cual significa que en ciertos germicidas si existen diferencias entre las cepas productoras o no de AB. Como se observa en la Figura (27), el cloro, SaniClean + agua electrolizada lograron una mayor reducción en cepas no productoras de AB en comparación con las productoras, mientras el ácido peracético fue el único que presentó una mayor reducción en cepas productoras de AB, en el caso de las BAL no productoras de AB observamos que el cloro fue el germicida con mayor reducción, únicamente el agua electrolizada mostró la misma capacidad de reducción en productoras y no productoras de AB. De forma general, el análisis estadístico de ANDEVA refuerza lo ya mencionado, pues en la misma figura podemos observar que el agua electrolizada fue el germicida con la menor reducción, seguido de SaniClean + agua electrolizada, después encontramos al cloro y finalmente tenemos el ácido peracético con la mayor reducción de la población.

Por otro lado, se puede observar una relación entre cepas productoras/no productoras de AB y la fuente de aislamiento, esto se debe a que desde pruebas preliminares se observó un sesgo importante entre cepas por fuente de aislamiento, pues al cada grupo de cepas ser aislado de alimentos con características diferentes esto les puede conferir capacidades distintas. Las condiciones del alimento que no sean favorables para el microorganismo podrían propiciar una selección de cepas con mayor tolerancia y/o el estrés provocar en las bacterias algún tipo de adaptación, lo cual pudo influir de forma significativa en la respuesta ante los distintos germicidas y tolerancia a los factores evaluados. Con base en este gráfico podemos observar de forma general, que las bacterias aisladas de queso mostraron ser más susceptibles a los germicidas empleados, donde las cepas provenientes de

queso y con capacidad de producción de AB fueron aquellas que mostraron ser más susceptibles a los germicidas empleados, caso contrario, las cepas provenientes de cerveza, mostraron una mayor tolerancia y por ende las reducciones efectuadas fueron menores, donde la menor reducción lograda fue para el caso de cepas no productoras, por lo cual se puede observar que realmente no se obtuvo un resultado para atribuir que la capacidad de producción de AB confiere cierta resistencia a la aplicación de germicidas en las cepas estudiadas.

Tabla 14. Valores de p obtenidos en el ANDEVA para la reducción en poblaciones de BAL aisladas a partir de queso madurado y cerveza artesanal para los principales efectos y sus interacciones.

| Factor * | Valor p |
|-------------------|---------------|
| Aminas | 0.9823 |
| Germicida | < 2.2e-16 *** |
| Aminas: Germicida | 7.122e-06 *** |

Signif. codes: 0 '***'

*Factor amina corresponde a mezcla de BAL productoras y no productoras de aminas biogénicas. Germicida corresponde a SaniClean + agua electrolizada, cloro, agua electrolizada y ácido peracético. Fuente corresponde al alimento del cual se aislaron las cepas (cerveza o queso).

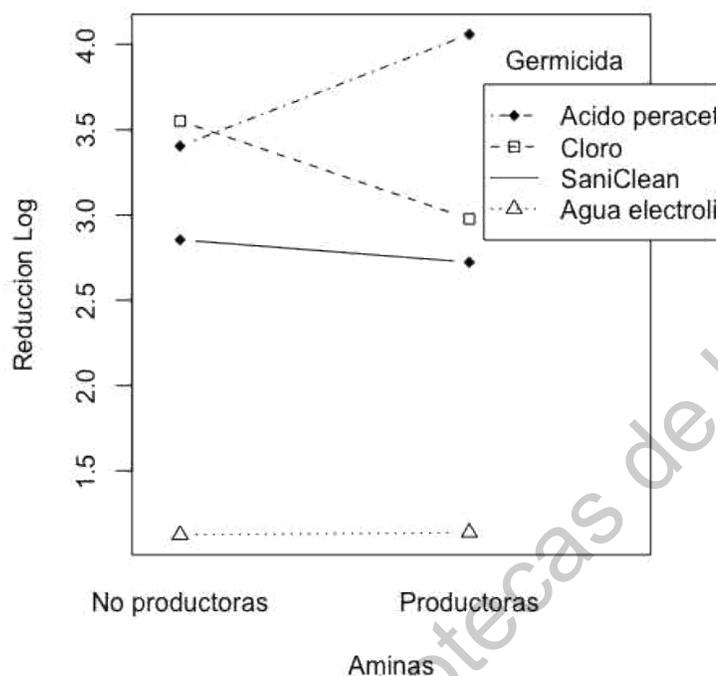


Figura 27. Gráfico de interacción entre cepas de BAL productoras/no productoras de aminas biogénicas y los germicidas.

Respuesta la reducción logarítmica de poblaciones de BAL.

Al observar los gráficos de interacción, podemos observar de forma gruesa que las cepas productoras aisladas de ambos alimentos fueron más tolerantes a los germicidas, pero las diferencias son más marcadas en las cepas obtenidas de cerveza. Esto es relevante en el control de estas cepas en las superficies, mueren más fácilmente las no productoras y las que persisten tienen mayor posibilidad después de dominar el ambiente, en caso de que se permita el desarrollo (nutrientes, humedad, temperatura).

Finalmente, al observar las reducciones efectuadas por cada uno de los 4 tratamientos estudiados en el presente trabajo, podemos ver que ninguno de ellos logró reducir las poblaciones de BAL en 5 LogUFC/cm^2 , por lo cual no se cumple lo recomendado por FDA para ser considerado un desinfectante eficaz (Henao *et al.*, 2003). Sin embargo, los antimicrobianos podrían emplearse en combinación con el

enfoque de barreras múltiples para obtener un nivel mayor de inactivación. La poca reducción de poblaciones de BAL obtenida en cada uno de los tratamientos aplicados podría deberse a la capacidad de estas cepas para adherirse y formar biopelículas (Trinh *et al.*, 2020), las cuales son una de las estrategias de supervivencia de los patógeno (Weerathne *et al.*; 2020) al conferir protección ante condiciones estresantes como es el caso de aplicación de germicidas (Trinh *et al.*, 2020). Fisher *et al.* (2017), reportaron que la formación y crecimiento de biopelículas son una causa potencial de la reducción de la efectividad de desinfectantes, además es bien sabido que la densidad celular y con ello el estrecho contacto entre células pueden propiciar la transferencia de genes, incluidos genes de resistencia a antibióticos lo cual es sumamente preocupante al aumentar la probabilidad de generar resistencias cruzadas. Otro aspecto relevante de las biopelículas que impacta directamente en la inocuidad es el hecho de que la generación de ellas puede propiciar que microorganismos que persisten en ambientes hostiles con baja posibilidad de sobrevivir, al alojarse en estas matrices extracelulares puedan sobrevivir e incluso reproducirse (Jara *et al.*; 2020)

Como puede observarse en la Tabla 7.4.2, todas las cepas productoras de AB usadas en la prueba para evaluar la susceptibilidad a germicidas son formadoras de biopelículas; aunque en el proceso de inoculación no se propició la producción de biopelículas, las células podrían haberse adherido y ello contribuir a la baja reducción observada en la población de BAL.

Para el caso de la tabla 15, la capacidad para formación de biopelículas de cada una de las cepas estudiadas se asignó con base a los parámetros que establecen Stepanovi *et al.* (2004) donde de acuerdo a la densidad óptica obtenida tras 48 horas de incubación y empleando el colorante cristal violeta como se data en la sección de métodos, se catalogan como no productores de biopelícula ($OD < OD.c$), productores de biopelículas débiles ($OD.c < OD < 2OD.c$), moderados ($2OD.c < OD < 4OD.c$) o fuertes ($OD > 4 OD.c$), donde el corte O.D. (D.O.c) se definió como tres desviaciones estándar por encima de la media de OD.del control negativo.

Sin embargo, para lograr reducir a niveles aceptables las poblaciones de BAL se podrían considerar tratamientos donde el tiempo de contacto con los germicidas sea mayor a 15 minutos, que fue el tiempo de contacto usado en las presentes pruebas, así, al aumentar el tiempo de contacto, se podría incrementar la reducción de las poblaciones microbianas e incluso podrían aumentarse las concentraciones de los germicidas, como en el caso del ácido peracético donde Kataria *et al.* (2020) vieron una reducción efectiva aplicando ácido peracético a 500ppm. Otra posibilidad serían los tratamientos consecutivos de varios desinfectantes.

Tabla 15. Capacidad de formación de biopelículas por parte de BAL aisladas de quesos madurados y cervezas artesanales.

| Cepa | OD* | Formación de Biofilm** |
|------|------|------------------------|
| ATCC | 0.46 | alto |
| 7C | 0.24 | moderado |
| 18C | 0.52 | alto |
| 19C | 1.56 | alto |
| Q10 | 1.29 | alto |
| Q18 | 0.29 | moderado |
| Q38 | 0.90 | alto |

*OD representa la media de tres repeticiones de medición de densidad óptica a 570nm **Capacidad asignada con base en los rangos de OD establecidos por Stepanovi *et al.* (2004).

VII. CONCLUSIONES

Los alimentos fermentados como queso y cerveza contienen BAL con potencial para producir AB.

Dentro de las condiciones que fueron sometidas las cepas productoras de AB estudiadas en el presente trabajo, el pH es el factor de mayor influencia de los probados para la producción de las AB, pues a pH 4 (cepas de queso y cerveza) se ve favorecida la producción de histamina, mientras a pH 5 se favorece la síntesis de tiramina (cepas de cerveza).

Algunas cepas de BAL productoras de AB son capaces de sobrevivir al proceso de fermentación alcohólica empleada en la transformación de mosto a cerveza, lo cual puede tener repercusiones en la inocuidad del producto final y permitir la producción de las AB durante su almacenamiento.

La aplicación de ácido peracético a 80ppm, cloro a 200ppm, agua electrolizada al 2% y EsteriClean al 2% por 1 minuto, resultó ineficiente para el saneamiento contra BAL depositadas en superficies de acero inoxidable al reducir un máximo de 2.6 Log UFC/mL en la población, por lo cual se recomendaría aplicar estrategias combinadas, además de la desinfección química, con la finalidad de lograr un saneamiento adecuado de las superficies.

VIII. REFERENCIAS

- ACERMEX. (2019). Estadística cervecera. Recuperado el 25 marzo de 2018.
ACERMEX. <http://acermex.org/cerveza-artesanal/>.
- Ahemed, E; Vijay, K. (2003). Microbial stress adaptation and food safety. Florida, EUA. CRC Express.
- Arena, M., Landete, J., Manca de Nadra, M., Pardo, I., Ferrer, S. (2008). Factors affecting the production of putrescine from agmatine by lactobacillus hilgardii xb isolated from wine. J. Appl. Microbiol. Vol. 105(1), pp. 158-165.
- Bai, X., Young, B., Mah, J. (2013). Formation and destruction of biogenic amines in Chunjang (a black soybean paste) and Jajang (a black soybean sauce). Food Chemistry, 141, 1026-1031.
- Baraggio, N., Velázquez, N., Simonetta, A. (2010). Aminas biógenas generadas por cepas bacterianas provenientes de alimentos lácteos y cárnicos. Ciencia y tecnología, 13.
- Benkerroum, N. (2016). Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. Comprehensive reviews in food science and food safety, 15, 801-826
- Bunřková, L., Adamcová, G., Hudcová, K., Velichová, H., Pachlová, V., Lorencová E., Bunřka F. (2013). Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the czech republic. Food Chemistry, 141, 548–551.
- CANILAC. (2018). Estado actual de la producción de lácteos en México. Recuperado el 12 de marzo de 2018. CANILAC. <https://www.carnilac-industrial.com.mx/estado-actual-de-la-produccion-de-lacteos-en-mexico/>
- CDC. (2019). Recuperado el 18 de marzo de 2018. National Outbreak Reporting System. <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>.
- Celis, F. (2018). Cada mexicano consume 65 litros de 'chela' al año. Recuperado el 12 de marzo de 2019. <https://www.forbes.com.mx/mexicanos-toman-ocho-litros-mas-de-cerveza-que-hace-cinco-anos/>

- CFSAN/FDA (2001). Sanitizers and detergents by Surfaces of utensils and equipment contacting potentially hazardous food. Recuperado el 12 de marzo de 2019. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Food and Drug Administration. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fc01-sup.html>
- Cousin, F., Guellec, R., Chuat, V., Dalmasso, M., Laplace, J., Cretenet, M. (2019). Multiplex pcr for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 17–24
- Chacón, L. (2013). Mexicanos consumen 6 kg de queso al año, recuperado el 12 de marzo de 2019. *Manufactura*.
<https://manufactura.mx/industria/2014/11/07/mexicanos-consumen-6-kg-de-queso-al-ano>
- De las Rivas, B., Marcobal, A., Crrascosa, A., Muñoz, R. (2006). Pcr detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *Journal of Food Protection*, 69, 2509–2514.
- De las Rivas, B., Marcobal, A., Muñoz, R. (2005). Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines, *FEMS Microbiology Letters*, 244, 367–372.
- De Pasquale, R. Di Cagno, S. Buchin, M. De Angelis, M. Gobbetti. (2018). Use of autochthonous mesophilic lactic acid bacteria as starter cultures for making pecorino crotonese cheese: effect on compositional, microbiological and biochemical attributes. *Food Research International*, 10.
- Del Río, B; Linares, D; Ladero, V; Begoña, R; Fernández, M; Cruz, M; Alvarez, M. (2014). Putrescine production via the agmatine deiminase pathway increases the growth of *Lactococcus lactis* and causes the alkalization of the culture medium. *Applied microbial and cell physiology*. DOI 10.1007/s00253-014-6130-8.
- Diario de gastronomía. (2018). Los fermentados, nueva tendencia emergente en alimentación. Recuperado el 16 de marzo DE 2019. *Diario de gastronomía*.
[http://diariodegastronomia.com/los fermentados-nueva-tendencia-](http://diariodegastronomia.com/los-fermentados-nueva-tendencia-)

emergente-alimentacion/.

Ekici, K., Omer, A. (2018). The determination of some biogenic amines in turkish fermented sausages consumed in van. *Toxicology Reports*, 5, 639–643.

El financiero. (2017). VINO MEXICANO, EL MÁS CONSUMIDO EN EL PAÍS EN 2016. Recuperado el 12 marzo de 2019.

<http://www.elfinanciero.com.mx/empresas/vino-mexicano-el-mas-consumido-en-el-pais-en-2016>.

Elizondo, J. (2014). Termotolerancia mediada por exometabolitos entre *Bacillus cereus* y *Geobacillus stearothermophilus* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

Elsanhoty, R., Ramadan M. (2016). Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. *Food Control*, 68, 220-228.

Esquivel, H. (2009). Incidencia, distribución y control de *Lysteria monocytogenes* durante el procesamiento de espinaca precocida y congelada. Universidad Autónoma de Querétaro. México. Tesis para obtener el título de maestro en ciencia y tecnología de alimentos. 17-19.

Estrella, V. (2018). Producción de vino ancla turística en qro, recuperado el 27 de marzo de 2019. *El economista*.

<https://www.economista.com.mx/estados/Produccion-de-vino-ancla-turistica-en-Qro-20180223-0004.html>

F.D.A. (2019). Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce - method to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. Recuperado 25 de marzo de 2019. FDA. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-5.html>.

FAO. (1998). La fermentación en pequeña escala. Recuperado el 16 de marzo de 2019. FAO. <http://www.fao.org/ag/esp/revista/9812sp3.htm>

Ferrer, S., Landete, J., Polo, L., Pardo, I. (2007). Las bacterias y su repercusión sobre las aminas biógenas. *International Symposium Microbiology and*

Food Safety of Wine. Food and Drug Administration (FDA) (1990). Descomposición de histaminas: raw, frozen tuna and malu malu, canned tuna, and related species. Revised compliance policy guide, Availability-Federal Register, 60, 149, pp.39574-39756.

Galgano, F., Caruso, M., Favati, F. (2009). Biogenic amines in wines: A review. ResearchGate, 173–203.

Gardini, F; Zaccarelli, A; Belletti, N; Faustini, F; Cavazza, A; Martuscelli, M; Mastrocola, D; Suzzi, G. (2005). Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. Food control, 16, 609-616

Gómez, M. (2019). Se incrementa en 8 por ciento el consumo de vino en México. Recuperado el 12 de marzo de 2019. La jornada. <https://www.jornada.com.mx/2018/06/17/sociedad/029n2soc>

Guarcello R., De Angelis M., Settanni L., Formiglio S., Gaglio R., Minervini F., Moschetti G., Gobbetti M., (2016). Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. Applied and Environmental Microbiology, 82, 23, pp 6870-6880.

Henao, S; Sierra, C; Gaitán, J. (2003). Actividad bactericida del ácido hipocloroso. Revista Facultad de medicina. 51, 3, 136-142. Recuperado en http://www.toucaneco.info/Actividad_bactericida_de_acido_hipocloroso.pdf

Heng, H; Adibah, N. (2019). Electroforesis, Electroforesis capilar: principios de capilar. Enciclopedia de ciencia analítica tercera edición (pp.328-333). Malasia: Universiti Teknologi Malaysia

Henríquez, K., Galarce, O., Aqueveque, P., García, A., Aranda, M. (2018). Dynamic of biogenic amines and precursor amino acids during cabernet sauvignon vinification. LWT - Food Science and Technology, 97, 238–244

Heredia, P. (2011). Caracterización del proceso de producción del queso cocido artesanal y de las principales bacterias ácido lácticas generadoras de

- aroma (Tesis de maestría). Centro De Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México.
- Izquierdo, P., Allara, M., Torres, G., García, A., Barboza, Y., Piñero, M. (2003). Histamina en quesos madurados: manchego, parmesano y de año. *Revista Científica*, 6, 431-435.
- Jara, J; Pérez, A; Del Solar, G; Rodríguez, J; Fernández, L; Orgaz, B. (2020). Papel de las biopelículas de *Lactobacillus* en la adhesión de *Listeria monocytogenes* a superficies de vidrio. *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos*, 334. Recuperado en <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108804>.
- Karoviková, J. Kohajdová, Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chemistry Paper*, 59, 1, pp. 55-59
- Kataria, J; Vaddu, S; Novoa, E; Shidu, G; Thippareddi, H; Singh, M. (2020). Evaluación de la eficacia del ácido peracético en *Salmonella* y *Campylobacter* en alitas de pollo a varios niveles de Ph. *Poultry Science*. 99, 10, 5137-5142.
- Kyanko, M., Russo, M., Fernández, M., Pose, G. (2010). Efectividad del ácido peracético sobre la reducción de la carga de esporas de mohos causantes de pudrición poscosecha de frutas y hortalizas. *Información tecnológica*, 21, 125-130.
- König, H; Unden, G; Fröhlich, J. (2009). Biology of Microorganisms on Grapes, in *Must and Wine*. 522p
- Landete, J., Ferrer, S., Pardo, I. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*, 18, 1569–1574.
- Latorre, M., Bover, S., Talon, R., Garriga, M., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M., Elias, E., Drosinos, E., Vidal, M. (2010). *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1, 20-25.
- León, P; Montoya, C; Motato, E; Granda, M; Caro, A; Restrepo, M; Echeverri, S; Valencia, J; Qunichía, L. (2006). Bacterias ácido lácticas silvestres

colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 13, 2, 26-35.

- Linares, D., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M., Álvarez, M.A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Microbiology*, 3, 180.
- Linares, D., Martín, M., Ladero, V., Álvarez, M., Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, pp.691-703.
- Liu, S; Xu, J; Ma, C; Guo, C. (2018). A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC, *Food Chemistry*. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.001>
- López, L; Romero, J; Ureta, R. (2002). Acción germicida in vitro de productos desinfectantes de uso común en la industria de alimentos.. *Research note*, 455, 4, pp.197-198.
- Luo, L; Wu, Y; Yu, T; Wang, Y; Chen, G; Tong, X; Bai, Y; Xu, Ch; Wang, YB; Ikuno, N; Hu, H. (2021). Método de evaluación y riesgos potenciales de bacterias resistentes al cloro (CRB): una revisión. *Water Research*. 188. Recuperado en <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116474>.
- Marques, A., Leitao, M., San Romao, M. (2008). Biogenic amines in wines: Influence of enological factors. *Food Chemistry*, 107, 2, 853-860.
- Mastrigt, O; Egas, R; Abee, T; Smid, E. (2019). Aroma formation in retentostat co-cultures of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Food microbiology*, 82, pp.151-159.
- McCabe-Sellers, B., Staggs, C., Bogle, M. (2006). Tyramine in food and monoamine oxidase inhibitor drugs: a crossroads where medicine, nutrition, pharmacy and the food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S58-S65.
- Misihairabgwi, J., Cheikhyoussef, A. (2017). Traditional fermented foods and

- beverages of namibia. *J Ethn Foods*, 4, 145-153.
- Mohammed, I; Bashammakh, A; Alsibaai, A; Alwael, H; El-Shahawi, M. (2016). A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 78, 84-94
- Moller, A; Ücok, E; Ratray, F. (2020). Comportamiento de formación de histamina de aislados bacterianos de queso curado. *Food Research international*. 128.
- Moracanin, S., Stefanovic, S., Radicevic, T., Borovic, B., Djukic, D. (2015). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from uzicka sausages. *Procedia Food Science*, 5, 308 – 31.
- Moreno, V., Lonvaud, A. (2001). Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine. *FEMS Microbiol Lett*, 195, 1, pp.103-7.
- Ochoa, A. (2017). Estudio comparativo del rendimiento y contenido de grado alcohólico por fermentación controlada con levaduras en agua miel de penca. Universidad del Azuay. Ecuador. Recuperado en <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/7541/1/13423.pdf>.
- Ordóñez, J., Troncoso, M., García, M., Callejón, R., (2016). Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages - A review. *Analytica Chimica Acta*, 939, 10-25.
- Ortiz de Zárate, M. (2017). Estudio sobre el mercado del vino en México (datos 2013 – 2016) Oficina Económica y Comercial de España en México. Editorial ICEX. Madrid, España. 63 p
- Pachlová, V., Buňková, L., Flasarová, R., Salek, R., Dlabajová, A., Butor, I., Buňka, F. (2018) biogenic amine production by nonstarter strains of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus paracasei* in the model system of dutch-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 97, 730–735.
- Pardo, D., (2014). Susceptibilidad bacteriana frente a cuatro soluciones germicidas. Recuperado el 27 de marzo de 2018. Universidad de Tolima.

<http://repository.ut.edu.co/bitstream/001/1199/1/RIUT-HAA-spa-2014-%20Susceptibilidad%20Bacteriana%20Frente%20A%20Cuatro%20Soluciones%20Germicidas.pdf>.

- Pérez, N. (2012). Determinación de la resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* aislada a partir de muestras de espinaca *Spinacea oleracea* utilizando germicidas para la desinfección de alimentos. Universidad de El Salvador. Recuperado el 27 de marzo de 2019 en http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2311/1/Determinaci%C3%B3n_de_la_resistencia_en_cepas_de_listeria_monocytogenes_aislada_a_partir_de_muestras_de_espinaca_Spinacea_oleracea_utilizando_germicidas_para_la_desinfecci%C3%B3n_de_alimentos.pdf.
- Petri, A., Pfannebecker, J., Fröhlich, J., König, H., (2013). Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiology*, 33, 48-54.
- Picón, Y. (2019). Beneficios y usos de leche de cabra y de vaca en la elaboración de diferentes tipos de yogurth. Recuperado el 22 de abril de 2019. Universidad Nacional de Trujillo. <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/12332/Picon%20Contra%20Yeimi%20Tatiana.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Poveda, J. (2019) biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: a statistical approach. *Food Control*, 96, 227–233
- Ramírez, C., Vélez, J. Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Información tecnológica*, 27, 115-128.
- Renes, E; Diezhandino, I; Fernandez, D; Ferrazza, R; Tornadijo, M; Fresno, M. (2014). Effect of autochthonous starter cultures on the biogenic amine content of ewe's milk cheese throughout ripening. *Food microbiology*, 44, 271-277.
- Renes, E., Diezhandino, I., Fernandez, D., Ferrazza, R., Tornadijo, M., Fresno, J. (2014). Effect of autochthonous starter cultures on the biogenic amine

content of ewe's milk cheese throughout ripening. *Food Microbiology*, 44, 271-277.

Romano, A; Ladero, V; Alvarez, M; Lucas, P. (2014). Putrescine production via the ornithine decarboxylation pathway improves the acid stress survival of *Lactobacillus brevis* and is part of a horizontally transferred acid resistance locus. *International Journal of Food Microbiology*. 175, 14–19.

Ruiz, C., Jiménez, J. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, pp.489-499.

Şanlı, T., Şenel, E. (2015). Processing and impact on active components in food. *ELSIEVER*, 27.

Schaechter M. (2015). A brief history of bacterial growth physiology. *Frontiers in microbiology*, 6, 289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00289>.

Sendra, J; Carbonall, J. (1999). Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA/CSIC). Valencia, España. Recuperado en http://www.cervezaysalud.es/wp-content/uploads/2015/05/Estudio_3.pdf.

Sint, D; Raso, L; Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *British ecological society*, 3, 898-905.

SměLa, D., Pechova, P., Komprda, T., Klejdus, B., Kubán, K. (2003). Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in a Meat Product during Fermentation and Long-term Storage. *Czech J. Food Sci*, 21, 167-175.

Stepanovi, S; Cirkoviz, I; Ranin, L; Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in applied microbiology*. 38, 428-432.

Tabernero, M., Bodas, R., Bartolomé, D., Posado, R., García, J., Olmedo, S. (2013). Agua electrolizada como higienizante en producción animal:

- efectos en sanidad y productividad. Arch. Zootec, 62, 13-23.
- Tango, C., Khan I., Kounkeu N., Franç P., Momna R., Hussain M. (2017). Slightly acidic electrolyzed water combined with chemical and physical treatments to decontaminate bacteria on fresh fruits. Food Microbiology, 67, 97-105.
- Tenorio, D., Mateos, I., Prádena, M., García, M., Pérez, M., Redondo, A., Villanueva, M., Zapata, M. (2014). El vino y su análisis. Universidad Complutense de Madrid. Recuperado el 30 de abril de 2019 en <https://eprints.ucm.es/29446/7/PIMCD%20N%C2%BA%20243.%20ANEXO%201.%20E-BOOK%20EL%20VINO%20Y%20SU%20AN%C3%81LISIS.pdf>
- Triki, M. (2013). Aminas biógenas en productos cárnicos más saludables en base a su contenido lipídico. Recuperado el 30 enero de 2019. Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/23680/1/T34942.pdf>
- Trinh, Q; Krishna, K; Salih, A; Listowski, A; Sathasivan, A. (2020). Biofilm growth on PVC and HDPE pipes impacts chlorine stability in the recycled water. Journal of Environmental Chemical Engineering. 8, 6. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104476>.
- Wacher, C., (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. Revista digital universitaria, 15.
- Weerarathne, P; Payne, J; Saha, J; Kountoupis, T; Jadeja, R; Jaroni, D. (2021) Evaluación de la eficacia del sulfato ácido de sodio para reducir *Escherichia coli* O157: H7 y sus biopelículas en superficies en contacto con alimentos. LWT Food Science and Technology. Recuperado en <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110501>.
- Zang, Y; Bing, Sh; Li, Y; Shu, D; Huang, A; Wu, H; Lan, L; Wu, H. (2019). Eficacia del agua electrolizada ligeramente ácida sobre la seguridad microbiana y la vida útil de los huevos sin cáscara. Poultry Science. 98, 11, 5932-59391.
- Zapparoli, G; Tosi, E; Krieger, S. (2006). Influence of the pH of Chardonnay must on malolactic fermentation induced by bacteria co-inoculated with yeast. University of Verona. Recuperado en

https://www.researchgate.net/publication/292666256_Influence_of_the_pH_of_Chardonnay_must_on_malolactic_fermentation_induced_by_bacteria_co-inoculated_with_yeasts

Zhao, W; Kang, Z. (2013). Advanced Progress on Adaptive Stress Response of *Oenococcus oeni*. Journal of Northeast Agricultural University. 20, 1, 91-96.

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

XI.- ANEXOS

Anexo I

Valoración de cloro libre

Colocar 25 mL de la muestra

Adicionar 10 mL de yoduro de potasio (KI) al 10% y 5 mL de ácido acético glacial, agitar.

Titular con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 M hasta aparición de color amarillo pálido,

Adicionar 1 mL de solución de almidón al 0.05%, agitar.

Titular con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 M hasta desaparición de color azul.

Cálculos:

$$\text{Cloro disponible} = V1 \times N1 \times 3.55 \times 10^4 / m$$

V1= volumen de tiosulfato de sodio consumido en la titulación (mL)

N1= Normalidad tiosulfato de sodio

m= cantidad de muestra

Esquivel, 2009.

Anexo II

Valoración de ácido peracético

Determinación del porcentaje de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Adicionar 10 mL de la muestra en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de H₂SO₄ 1N.

Agregar dos gotas de indicador de ferroína y mezclar.

Titular con tiosulfato cérico 0.1N hasta que persista la desaparición del color naranja.

Registrar lectura como punto de equivalencia.

Determinación del porcentaje de ácido peracético (APA)

Después de alcanzar el punto de equivalencia anterior, agregar 10 mL de solución de yoduro de potasio y 2 mL de solución de almidón al 1%.

Titular rápidamente con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.1N hasta que color naranja desaparezca

Registrar mL de tiosulfato gastados.

Cálculos:

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 = V1 \times N1 \times \text{meq H}_2\text{O}_2 \times F1 \times 100 / m$$

V1= volumen de sulfato cérico consumido en titulación de H₂O₂ (mL)

N1= normalidad sulfato cérico

F1= factor de dilución

m= cantidad de muestra

$$\% \text{APA} = V2 \times N2 \times \text{meqAPA} \times F2 \times 100 / m$$

V2= volumen de tiosulfato de sodio consumido en la titulación de APA

N2= normalidad de tiosulfato de sodio.

F2= factor de dilución

m= cantidad de muestra

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Esquivel, 2009.

Anexo III

Determinación azúcares reductores.

■ Preparación reactivo de Fehling-Causse-Bonnans :

| | |
|---|---------|
| Tartrato doble de sodio y potasio (sal de Seignette)..... | 130 g |
| Hidróxido de sodio..... | 110 g |
| Sulfato de cobre pentahidratado..... | 24 g |
| Ferrocianuro de potasio..... | 16,8 g |
| Agua c.s.p..... | 1000 ml |

- Titulación del reactivo Solución testigo de glucosa. Disolver 5 g de glucosa anhidra y llevar a 1000 ml en matraz aforado con agua destilada.

Medir 15 ml de reactivo de F.C.B. en erlenmeyer de 250 ml. Agregar 50 ml de agua destilada. Llevar a ebullición y cuando comienza a hervir agregar desde bureta para azúcares la solución testigo a una velocidad de 2-3 gotas por segundo, hasta que el color azul del reactivo pase a verdoso o que se aclare bastante. Interrumpir el agregado de solución azucarada y agregar 2 gotas de azul de metileno al 1%. Toma color azul intenso nuevamente. Continuar el goteo más lentamente (1 gota por segundo) hasta que aparece color amarillo (por el ferrocianuro presente). Durante la titulación debe mantenerse una ebullición suave

- Cálculos:

Si se gastó 8,2 ml de solución de glucosa

1000 ml sol glucosa.....5 g glucosa

8,2 mlx= 0,041 g glucosa

o sea que 15 ml de reactivo de F.C.B. dosan 0,041 g glucosa. Título F.C.B. = 0,041 g glucosa

- Valoración de azúcares reductores: (ej. glucosa, fructosa, lactosa) Proceder como en la titulación del reactivo reemplazando la solución de glucosa por la solución a valorar. Cálculos:

Suponiendo un gasto de 7 ml:

7 ml de sol. azucarada reductora.....0,041 g

100 mlx = 0,041 x 100 = 0,287 g expresado como glucosa

Ochoa, 2017.

Anexo IV

Grado alcohólico (OIV-MA-AS312-01A: R2016)

Destilación directa seguida de densidad relativa por picnometría.

- Medir 50 mL de vino (libre de CO₂) con ayuda de un matraz aforado.
- Verter en un matraz bola de 125 mL.
- Agregar al matraz 2.5 mL de solución 2 M de Ca(OH)₂ y perlas de ebullición.
- Destilar la mezcla hasta alcanzar $\frac{3}{4}$ partes del volumen aproximadamente.
- Vaciar el producto recolectado en un matraz volumétrico de 50 mL y al alcanzar los 20 °C aforar con agua destilada.
- Medir la densidad con ayuda de un picnómetro a 20 °C.
- Obtener el grado alcohólico consultando en las tablas de correspondencia de la OIV.

Ochoa, 2017.

Anexo V

Acidez total titulable

Titulación con una solución de NaOH 0.1M.

- Tomar alícuotas de 10 mL y eliminar el CO₂, agitando durante 10 con un imán en un plato de calentamiento.
- Posteriormente, a cada solución medir el pH
- Titular con la solución de NaOH valorada.
- Finalizar titulación cuando se alcance un pH = 8.2.
- Λα αχιδεζ σε εξπρεσα εν γ/Λ δε κχιδο τλκχιχο, υπιλιζανδο λα σιγυιεντε εχναχι¹ν:

$$\frac{\text{—} \acute{\alpha} \cdot \acute{\alpha}}{=} \quad \frac{(\cdot)(90)}{}$$

Ochoa, 2017.