



2024ko Apirilaren 25a - ZAMUDIOKO  
PARKE TEKNOLOGIKOA

**ELIKAGAIEN  
SEGURTASUNAREN  
ARLOKO IKERKETA  
EMAITZAK  
TRANSFERITZEKO**

# XI. JARDUNALDIA JORNADA

**DE TRANSFERENCIA DE  
RESULTADOS DE  
INVESTIGACIÓN EN  
SEGURIDAD ALIMENTARIA**

25 de abril 2024  
PARQUE TECNOLÓGICO DE ZAMUDIO



## ÍNDICE

1. Objetivos del proyecto
2. Resultados relevantes para reducir riesgos en la cadena agroalimentaria vasca
3. Agentes colaboradores de la cadena agroalimentaria vasca y aplicabilidad en su sector
4. Actividades de difusión y transferencia realizadas

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN  
QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)



# 1. OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Identificar las variables tecnológicas cuya modificación en la elaboración de quesos daría lugar a productos seguros libres de aminas biógenas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y experimentar a escala piloto con la adición de posibles microorganismos potencialmente degradadores de aminas biógenas cuya aplicación junto a los fermentos iniciadores den lugar a quesos de pasta prensada no cocida de leche de vaca pasteurizada de calidad libres de aminas biógenas.
- Aportar una solución fácil al sector quesero tradicional para que comercialicen productos más saludables para la población general.

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN  
QUESOS CURADOS DE PASTA PENSADA (ELAMINA)



## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 1: Caracterización microbiana de los quesos con concentración elevada de histamina y tiramina

Tabla 1. [AB] en muestras de pastas prensadas comerciales

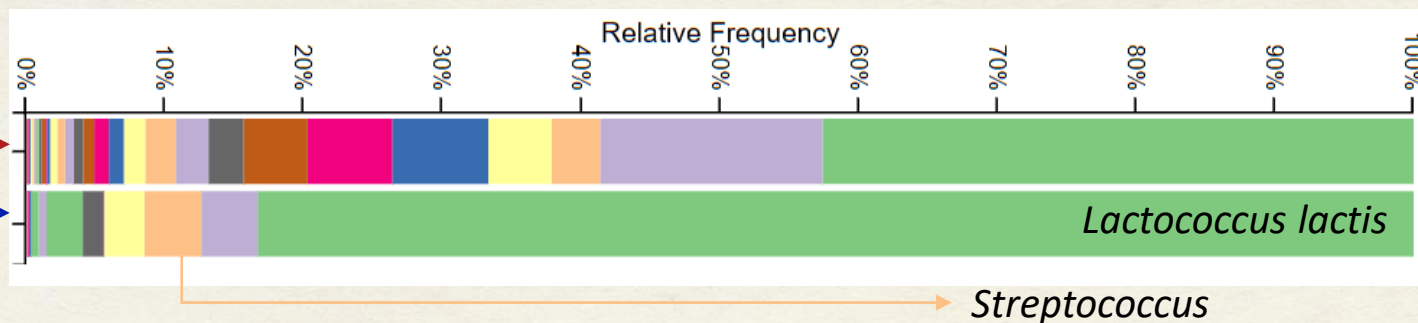
#	Nº	Histamina (mg/g)	Tiramina (mg/g)
Alta	25	1,010	0,657
Alta	26	0,759	0,128
Alta	28	0,498	1,460
Alta	46	0,000	3,863
Baja	29	0,000	0,000
Baja	30	0,014	0,000
Baja	31	0,000	0,010
Baja	42	0,029	0,000

### METAGENÓMICA

Figura 1. Taxonomía del pool de quesos con elevados niveles de aminas biógenas (superior) y con bajos niveles de aminas biógenas (inferior).

POOL  
ALTO AB

POOL  
BAJO AB



ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)



## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 1: Caracterización microbiana de los quesos con concentración elevada de histamina y tiramina

- > biodiversidad de microorganismos presentes en la mezcla de quesos con elevados porcentajes de AB que en el pool con baja concentración
  - H: quesos probablemente elaborados con leche cruda con alta capacidad proteolítica
- *Lactococcus lactis* predominante → ≈ Género *Streptococcus*
  - especies bacterianas habitualmente presentes en los fermentos comerciales acidificantes
- *Lactococcus lactis* y el género *Streptococcus*: pool con baja concentración de AB > % que en el de altas concentraciones
  - H1: quesos con baja concentración de AB sean pasteurizados → mayor abundancia de fermentos comerciales
  - H2: *L. lactis* sea dominante por ser degradador de aminas biógenas (Anderegg et al., 2020; Renes et al., 2018, Herrero-Fresno et al., 2012).

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN  
QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)

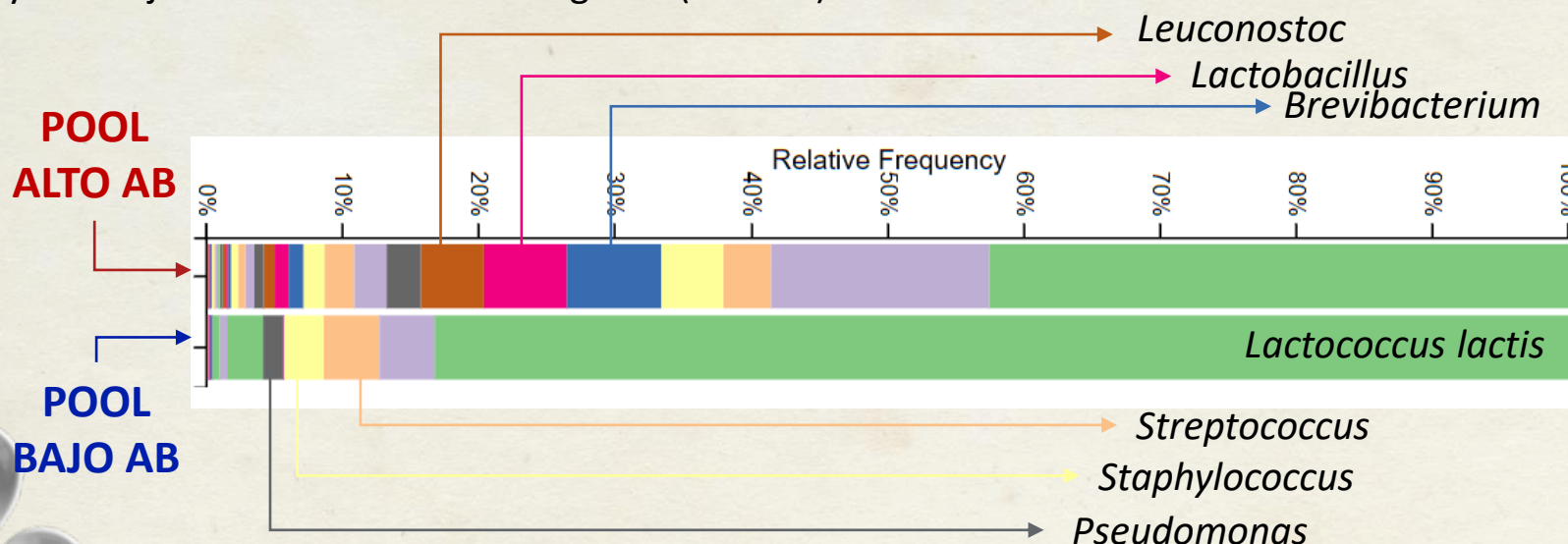


## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 1: Caracterización microbiana de los quesos con concentración elevada de histamina y tiramina

#### METAGENÓMICA

Figura 1. Taxonomía del pool de quesos con elevados niveles de aminas biógenas (superior) y con bajos niveles de aminas biógenas (inferior).



- Diferencias entre los perfiles de ambos pools
- Por proporcionalidad de algunos microorganismos: Géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium*, etc.
- Por ausencia de algunos en pool bajo en AB : Géneros *Leuconostoc*, *Lactiplantibacillus*, etc.

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)



## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 2: Identificación de microorganismos con capacidad productora de histamina y tiramina en pool con elevada concentración de AB

- 64 colonias blancas pequeñas
- 77 colonias blancas grandes

Desarrollo de m.o. en caldo y agar enriquecido en HISTAMINA en anaerobiosis

Aislamiento de colonias en agar MRS y aerobiosis

- 54 colonias blancas pequeñas
- 64 colonias blancas grandes



- HdcA: Ninguna colonia portadora
- TdcA: 100% y 87% colonias grandes y pequeñas, respectivamente

Identificación de gen productor de descarboxilasa de a.a.

- Microorganismos con capacidad de descarboxilar tirosina → pH del medio y capacidad de desarrollarse en alimentos con concentraciones elevadas de aminas biógenas
- Presencia de colonias que no posean ni HdcA ni TdcA → no todas las bacterias morfológicamente iguales aisladas son la misma cepa (genotipos y/o fenotipos diferentes)

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)

## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 2: Identificación de microorganismos con capacidad productora de histamina y tiramina en pool con elevada concentración de AB

- 31 colonias amarillas
- 6 colonias blancas secas
- 17 colonias blancas medianas
- 80 blanquecinas mucosas

Desarrollo de m.o. en caldo y agar enriquecido en TIRAMINA en anaerobiosis

Aislamiento de colonias en agar MRS y aerobiosis

- 26 colonia amarillas
- 17 colonias blancas medianas
- 6 colonias blancas secas



- Hdca: Ninguna colonia portadora
- Tdca: 11,5%, 35,3%, 50% colonias de cada morfología, respectivamente

Identificación de gen productor de descarboxilasa de a.a.

- Menor proporción presencia de Tdca en comparación a los caldos enriquecidos con histamina
- Presencia de colonias que no poseen ni Hdca ni Tdca → no todas las bacterias morfológicamente iguales aisladas son la misma cepa (genotipos y/o fenotipos diferentes)

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)





## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 2: Identificación de microorganismos con capacidad productora de histamina y tiramina en pool con elevada concentración de AB

- De las 167 colonias aisladas tanto de los caldos enriquecidos en histamina como en tiramina, ninguna de ellas presentó el gen Hdca y un 76,7% de ellas lo presentó para Tdca (en línea con Herrero-Fresco et al., 2012)
  - H1: Supervivientes a las elevadas concentraciones de histamina tiramina
  - H2: Degradadoras de histamina y tiramina → interés para el sector quesero
- Las colonias positivas para Tdca se consideran las responsables de la elevada concentración de tiramina en el queso
- No se puede descartar que haya habido otras bacterias presentes en el queso a lo largo de su periodo de maduración que también hayan intervenido en la creación de estos compuestos y que no se hayan podido identificar en su momento de análisis por degradación de su material genético.
- 5 colonias fueron identificadas por técnicas de biología molecular (WGS) dando los siguientes resultados de microorganismos portadores del gen Tdca: *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium variable*, *Corynebacterium flavescens*, *Corynebacterium glyciniphylum* y *Yarrowia lipolytica*.

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN  
QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)



## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 3: Identificación de fermentos específicos que den lugar a quesos libres de histamina y/o tiramina



3 LOTES: elaboraciones experimentales x 3 repeticiones

- LOTE K: 20L leche de vaca + Fermentos Comerciales - Control (MA 4001; *L. lactis* (3 subsp.) + *S. thermophilus*)
- LOTE P: 20L leche de cada + MA 4001 + *L. plantarum*
- LOTE C: 20L leche de vaca + MA 4001 + *L. casei*

- Todos los lotes se suplementaron con histamina y tiramina en una concentración de 250 mg/L de cada analito.
- Todos los microorganismos añadidos, hipotéticamente, son degradadores de AB (Anderegg et al., 2020; Renes et al., 2018; Herrero-Fresno et al., 2012; Guarcello et al., 2014)
- MA4001: fermento comercial habitual en queserías para elaborar pastas prensadas no cocidas
- *L. plantarum* y *L. casei*: habituales en los quesos de pasta prensada por lo que no interferirían en la calidad de estos quesos añadidos como adjuntos

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN  
QUESOS CURADOS DE PASTA PENSADA (ELAMINA)



## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 3: Identificación de fermentos específicos que den lugar a quesos libres de histamina y/o tiramina

3 LOTES x 3 repeticiones x 4 tiempos de maduración (n=36)

- Semana 1
- Mes 1
- Mes 2
- Mes 4



Por cada elaboración, 3 submuestras.  
Conservación a vacío y -80°C hasta análisis:

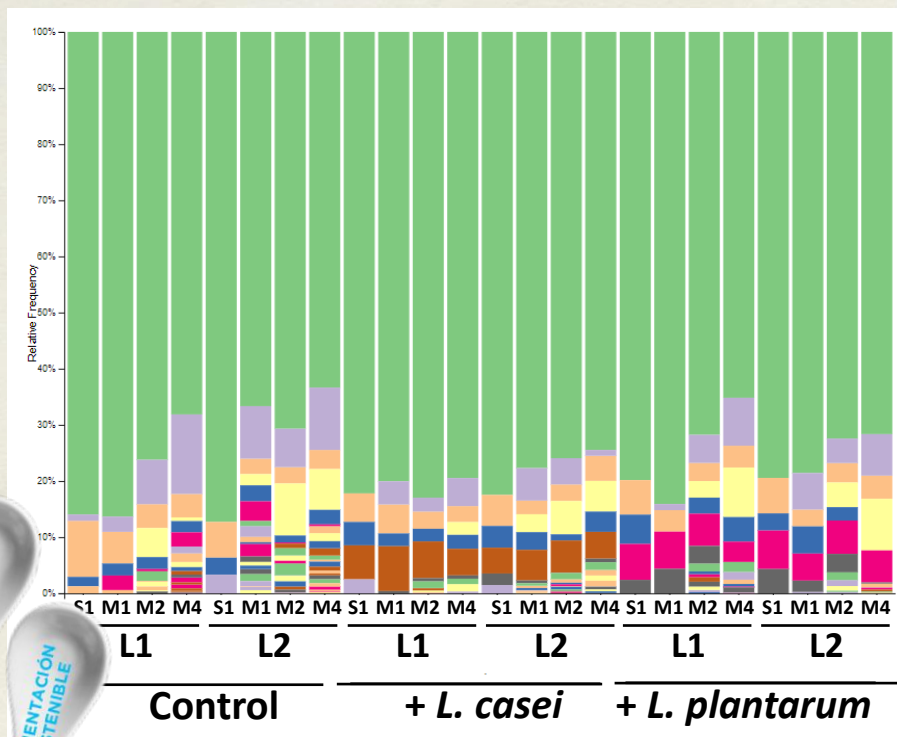
- 1: Metagenómica 16S
- 2: Análisis AB (HPLC, CSIC-IPLA)
- 3: Extracto seco

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN  
QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)

## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 3: Identificación de fermentos específicos que den lugar a quesos libres de histamina y/o tiramina

Figura 2. Diversidad bacteriana en lotes experimentales añadidos a lo largo del periodo de muestreo



#### FACTOR: FERMENTO

#### RESULTADOS METAGENÓMICA

- En general, *L. lactis* (verde), el género *Streptococcus* (naranja) y *Lactococcus* (azul) mayor abundancia relativa en todas las muestras → MA 4001.
- En rosa: Género *Lactiplantibacillus* → *L. plantarum*
- En marrón: *Lacticaseibacillus rhamnosus* → *L. casei*
- La comunidad bacteriana de las elaboraciones control, control + *L.casei* y control + *L.plantarum* se diferencian entre sí, únicamente por la presencia de los fermentos añadidos deliberadamente (p-valor < 0,001).

## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 3: Identificación de fermentos específicos que den lugar a quesos libres de histamina y/o tiramina

Tabla 2. Concentración de AB en los quesos elaborados con suplementación de AB, con distinta combinación de fermentos y muestreados en distintos tiempos de maduración.

#### FACTOR: FERMENTO

#### RESULTADOS AMINAS BIÓGENAS

- No se observaron diferencias significativas en la concentración de AB para el tipo de fermentos utilizado (P-valor > 0,05)

Fermentos	Muestreo	Histamina (mg/kg ES queso)		Tiramina (mg/kg ES queso)	
		Media	DS	Media	DS
Control	S1	518,45	23,87	612,99	25,44
	M1	418,04	98,67	441,44	84,11
	M2	348,09	85,18	319,37	43,16
	M4	219,68	46,39	268,62	41,76
+ <i>L. casei</i>	S1	533,39	60,26	629,62	69,04
	M1	484,75	25,80	538,18	73,21
	M2	373,46	25,21	370,34	33,99
	M4	298,97	29,03	404,39	97,84
+ <i>L. plantarum</i>	S1	534,82	28,70	619,21	35,34
	M1	409,88	78,44	424,92	100,49
	M2	352,59	79,14	333,35	76,55
	M4	253,86	61,23	337,63	79,11

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA Prensada (ELAMINA)



## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 3: Identificación de fermentos específicos que den lugar a quesos libres de histamina y/o tiramina

#### FACTOR: FERMENTO

#### RESULTADOS GENERALES

- El metabolismo bacteriano con respecto a las AB (supervivencia, generación de metabolitos, destrucción de metabolitos) fue igual para todas las elaboraciones experimentales.

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN  
QUESOS CURADOS DE PASTA Prensada (ELAMINA)



## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

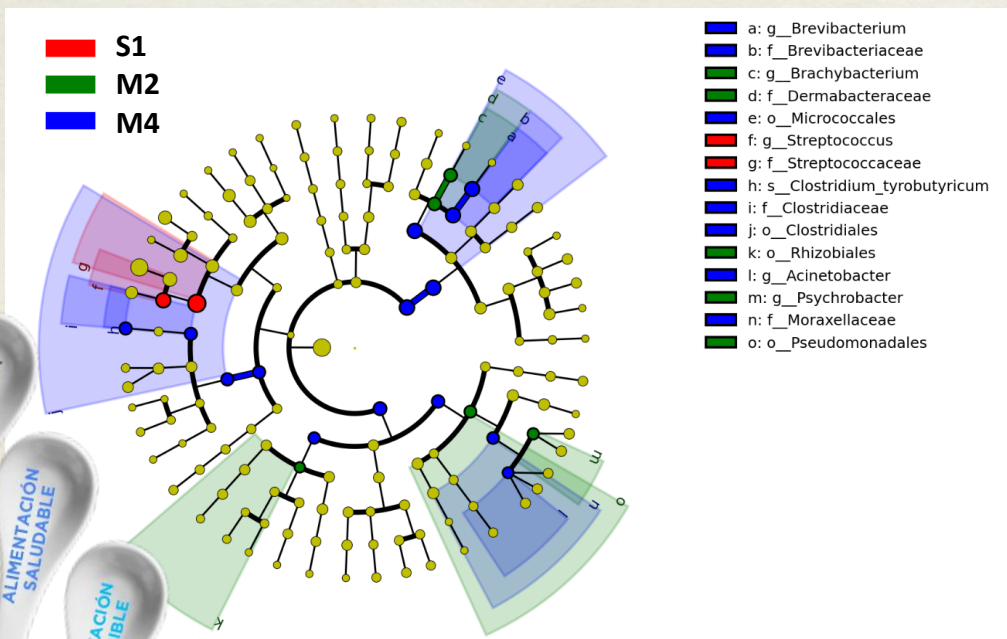
### ACCIÓN 3: Identificación de fermentos específicos que den lugar a quesos libres de histamina y/o tiramina

Figura 3. Cladograma donde se representa la ramificación de las bacterias identificadas en las muestras analizadas a lo largo del periodo de maduración de los quesos experimentales.

#### FACTOR: TIEMPO DE MADURACIÓN

#### RESULTADOS METAGENÓMICA

- Diferencia significativa entre S1, M2 y M4 ( $p < 0,001$ ).
- S1: > % del género *Streptococcus* → *S. thermophilus* añadido en los fermentos acidificantes MA4001
- M2: Género *Brachy bacterium* no presente en S1 y M1 → Podría deberse a la presencia de *Brachy bacterium nesterenkovi* en la leche, bacteria termodúrica con potencial proteolítico y lipolítico (Gvozdyak et al., 1992; Ribeiro Júnior et al., 2017).
- M4:
  - Género *Brevibacterium*: Habitual en quesos de corteza lavada para lograr el desarrollo de los fermentos “del rojo” → Contaminación cruzada en cámara de maduración.
  - *Clostridium tyrobutyricum*: Esperable, quesos hinchados → Defecto quesero habitual en quesos elaborados con leche de vaca que ha consumido silo.



ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA Prensada (ELAMINA)



## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

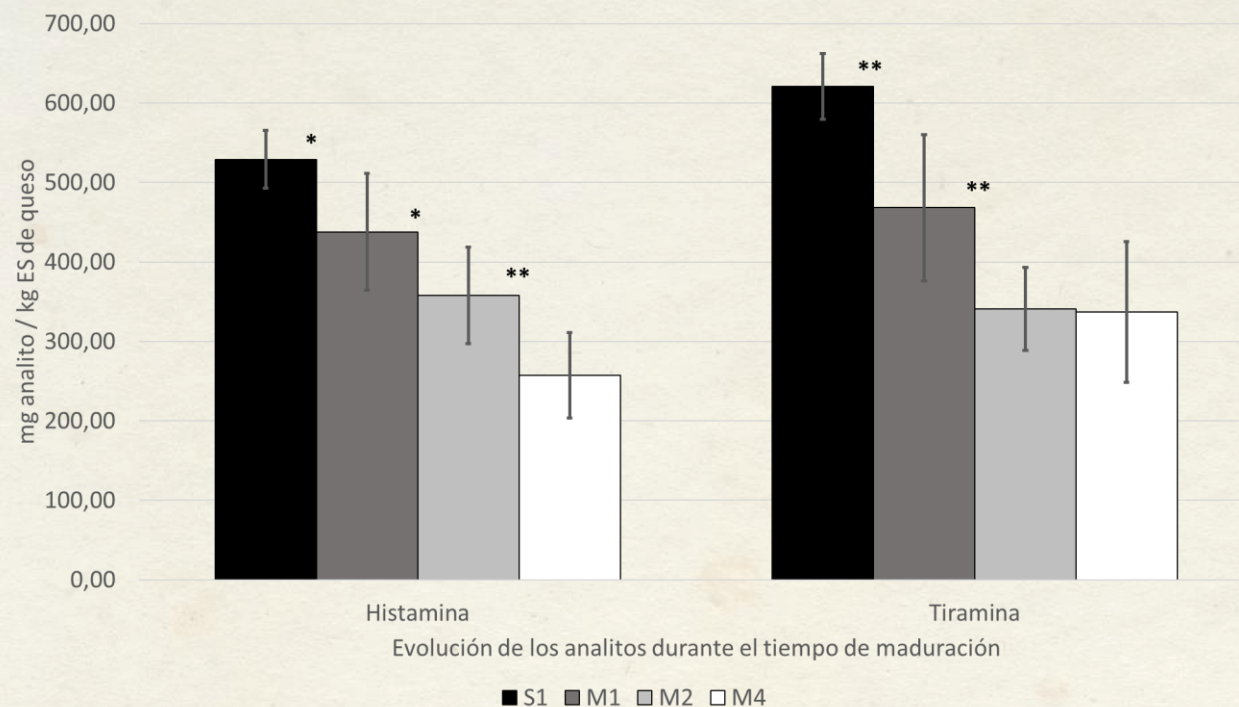
### ACCIÓN 3: Identificación de fermentos específicos que den lugar a quesos libres de histamina y/o tiramina

#### FACTOR: TIEMPO DE MADURACIÓN

#### RESULTADOS AMINAS BIÓGENAS

- Diferencia significativa (P-valor  $\leq 0,05$ ).
- En total, entre la semana 1 y el mes 4 de maduración hubo un descenso de 271,39 mg/kg ES (51,31 % de descenso) de histamina y de 283,73 mg/kg ES (45,72 % de descenso) de tiramina.
- En ningún caso se sobrepasa la dosis máxima de AB en 30g de queso para personas sanas, existiendo un riesgo para personas sensibles a la histamina y medicadas con IMAO clásicas (EFSA, 2011).

Figura 4. Concentración de AB en quesos muestreados en distintos momentos de maduración



\*, p-valor < 0,05; \*\*, p-valor < 0,01; \*\*\*, p-valor < 0,001





## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 3: Identificación de fermentos específicos que den lugar a quesos libres de histamina y/o tiramina

#### FACTOR: TIEMPO DE MADURACIÓN

#### RESULTADOS GENERALES

- *L. lactis* fue el microorganismo principal en todas las muestras analizadas → podría ser el responsable del descenso de histamina y tiramina a lo largo del periodo de maduración (Renes et al., 2018; Guarcello et al., 2014).
- *S. thermophilus* diferenció la comunidad de la semana 1 con respecto al mes 2 y 4 → podría haber sido un coadyuvante de *L. lactis* en la degradación de la semana 1 al mes 1 y del mes 1 al mes 2 en esta tarea (Guarcello et al., 2014)
- La disminución de histamina de M2 a M4 podría haberse debido a la acción de *L. lactis* en combinación con la acción del género *Brevibacterium*, diferenciador en el mes 4 y degradador de aminas biógenas (Leuschner y Hammes, 1998; Leuschner, 1998).

← ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA Prensada (ELAMINA)



## 2. RESULTADOS RELEVANTES PARA REDUCIR RIESGOS

### ACCIÓN 3: Identificación de fermentos específicos que den lugar a quesos libres de histamina y/o tiramina

#### LIMITACIONES DE LOS RESULTADOS

- Las necesidades del proyecto llevaron a realizar quesos pequeños → elevada pérdida de humedad → limitante en el desarrollo bacteriano normal
- Posibilidad de que las cepas comerciales añadidas no tengan un especial comportamiento degradador de aminos biógenos con respecto a otras dominantes (*L. lactis*).
- Se espera poder resolver estas limitaciones con la continuación de esta línea de investigación.

← ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN  
QUESOS CURADOS DE PASTA Prensada (ELAMINA)



### 3. AGENTES COLABORADORES DE LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA Y APLICABILIDAD

#### AGENTES COLABORADORES DE LA CADENA AGROALIMENTARIA

- Queserías productoras de pastas prensadas.
- Queserías productoras de Euskal Gaztak (todos ellos elaborados con leche certificada Eusko Label) y HAZI Fundazioa como entidad certificadora.
- Agentes del sector quesero vasco (tanto a productores a título personal, como a través de las distintas asociaciones).

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)



### 3. AGENTES COLABORADORES DE LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA Y APLICABILIDAD

#### APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS

- Se ha identificado a la población bacteriana de quesos comerciales de pasta prensada con altas y bajas concentraciones de aminas biógenas, así como su capacidad para producir histamina y tiramina, lo que ha permitido aumentar el conocimiento sobre qué posibles microorganismos pueden ser beneficiosos, perjudiciales o deben ser elegidos en combinación con otros para poder obtener quesos de calidad libres de aminas biógenas en el mercado.
- Las cepas comerciales *L. casei* y *L. plantarum* utilizadas en este estudio no mostraron un efecto degradador de histamina y tiramina en comparación a las elaboraciones control. Si bien se deben solventar las limitaciones del estudio mencionadas, en estos momentos, no se podría recomendar la utilización de estas cepas en queserías si el objetivo es disminuir lo máximo posible la presencia de estos analitos en los productos finales.
- Los quesos experimentales del proyecto a medida que se elevaba su periodo de maduración, pese a la inoculación inicial de histamina y tiramina y a incrementarse la proteólisis, no supusieron una mayor generación de AB debido, posiblemente, al efecto protector de la comunidad microbiana de esta matriz alimentaria, lo que pone de manifiesto los beneficios de una comunidad bacteriana adecuada y controlada en los alimentos fermentados para garantizar la seguridad alimentaria.

ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA PENSADA (ELAMINA)



## 3. AGENTES COLABORADORES DE LA CADENA AGROALIMENTARIA VASCA Y APLICABILIDAD

### APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS

- En 4 meses de maduración, los quesos de pasta prensada no cocida elaborados con el fermento acidificante MA4001 con inoculación deliberada de histamina y tiramina (0,25g/L de cada analito) redujeron significativamente la concentración de histamina (51,31 %) y de tiramina (45,72 %), lo que implica que la utilización de este fermento comercial es útil para disminuir de forma elevada las aminas biógenas que se puedan producir a lo largo del proceso de maduración del queso por bacterias que presenten el gen TdcA y/o Hdca.
- Pese a la inoculación en grandes dosis de histamina y tiramina en la leche para elaborar pastas prensadas no cocidas (0,25g/L de cada analito), en ningún punto de muestreo se dieron concentraciones que sobrepasaran las dosis máxima de ninguno de los dos compuestos en una ración de queso de 30g para personas sanas, existiendo un riesgo para personas sensibles a la histamina y personas medicadas con IMAO clásicas, lo que pone de manifiesto que, pese a haber encontrado en GAZTAMINA un porcentaje de quesos inseguros para la población, es verdaderamente complicado que se den estas concentraciones en quesos con comunidades bacterianas adecuadas y controladas.
- Se requiere de una mayor investigación en este campo, solventando las limitaciones del presente proyecto y a través de todos los avances disponibles en investigación con biología molecular para poder identificar las características genéticas que determinan la capacidad no solo de producir aminas biógenas sino de destruirlas en matrices lácteas, bien sea por su utilización en el metabolismo celular microbiano o por su capacidad degradadora por ser considerado un tóxico para ellas y ponerlas al servicio del sector lácteo y quesero de la CAPV para la producción de quesos seguros y de calidad.

← ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)



## 4. ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA

- **Diciembre 2022:** Difusión del proyecto en general a través de la web de Esneki Zentroa – Leartiker
- **Marzo 2023:** Newsletter a través de Esneki Zentroa – Leartiker
- **Abril 2024:** Espacio de divulgación de resultados en la web de Esneki Zentroa – Leartiker
- **Abril 2024:** XI Jornadas de transferencia de resultados de investigación en Seguridad Alimentaria
- **Octubre 2024:** IDF World Dairy Summit Congress (París)



ESTRATEGIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN QUESOS CURADOS DE PASTA PRENSADA (ELAMINA)





**EUSKO JAURLARITZA**



**GOBIERNO VASCO**

EKONOMIAREN GARAPEN,  
JASANGARRITASUN  
ETA INGURUMEN SAILA  
OSASUN SAILA

DEPARTAMENTO DE DESARROLLO  
ECONÓMICO, SOSTENIBILIDAD  
Y MEDIO AMBIENTE  
DEPARTAMENTO DE SALUD