
Evaluación de la producción de aminas biógenas en bacterias ácido-lácticas aisladas de alimentos tradicionales fermentados naturalmente¹

Duvan Felipe Torrado García², Yhon Wilmar Gómez Rendón³, Francia Elena Valencia García⁴

Resumen

Introducción. Las Aminas Biógenas (AB) son bases orgánicas nitrogenadas producto del metabolismo secundario de microorganismos sobre sustratos proteicos, debido a la actividad aminoacil-descarboxilasa favorecida por condiciones fisicoquímicas, presencia, biodisponibilidad de aminoácidos y algunos cofactores. La ingestión de estas puede deteriorar la salud de los consumidores, manifestándose con episodios de diarrea, incluso alergias severas y cáncer, también son utilizadas como indicadores de calidad e higiene en alimentos fermentados. Estas características hacen necesario que se evidencie la capacidad de algunas cepas nativas para producir este tipo de compuestos. **Objetivo.** Establecer la abundancia relativa de microorganismos aislados de masato de arroz, champús y almidón de yuca agrio fermentados de manera natural y detectar la producción de AB. **Metodología.** Se evaluaron 254 especies de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL),

las cuales fueron aisladas de alimentos tradicionales fermentados (Masato de arroz, Almidón de Yuca agrio y Champús), posteriormente se identificaron mediante ARNr 16S y las AB fueron evaluadas empleando el caldo descarboxilasa y el Agar Lisina Hierro modificado, las cepas positivas fueron confirmadas con el metabolismo del glicerol. **Resultados.** Se encontró diversidad de géneros y especies microbianas con diferentes abundancias relativas en los productos analizados, siendo común la presencia de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Weissella*, además ninguno de los aislados evidenció la capacidad para producir AB. **Conclusión.** Ninguna de las especies nativas aisladas del masato de arroz, champús y almidón de yuca agrio producen AB, lo que resulta de interés para emplear estas cepas en el desarrollo de alimentos fermentados sin que presenten efectos adversos en la salud de las personas.

Palabras clave: aminas biógenas, aminoácidos, alimentos fermentados, inocuidad.

¹ Artículo original derivado de la investigación “Alimentos vegetales con funcionalidad probiótica para poblaciones infantiles desnutridas (PROINFANT)”. Trabajo realizado desde la Universidad de Antioquia – Colombia, con el apoyo del grupo de investigación Biotransformación, en el año 2020. Financiado por Ministerio de ciencia, tecnología e innovación de Colombia (Minciencias).

² Estudiante de pregrado en Microbiología Industrial y Ambiental, Escuela de microbiología. Email: duvan.torrado@udea.edu.co.

³ Estudiante de pregrado en Microbiología Industrial y Ambiental, Escuela de microbiología. Email: wilmar.gomez@udea.edu.co.

⁴ PhD en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias; Docente Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Email: francia.valencia@udea.edu.co. ORCID: 0000-0002-4167-2167

Evaluation of the production of biogenic amines in lactic acid bacteria isolated from traditional foods naturally fermented

Abstract

Introduction. Biogenic Amines (AB) are nitrogenous organic bases product of the secondary metabolism of microorganisms on protein substrates, due to the aminoacyl-decarboxylase activity favored by physicochemical conditions, presence, bioavailability of amino acids and some cofactors. The ingestion of these can deteriorate the health of consumers, manifesting itself with episodes of diarrhea, even severe allergies and cancer, they are also used as indicators of quality and hygiene in fermented foods. These characteristics make it necessary to demonstrate the ability of some native strains to produce this type of compound.

Objective. Establish the relative abundance of microorganisms isolated from naturally fermented rice masate, shampoos, and sour cassava starch and detect AB production.

Methodology. 254 species of Lactic Acid Bacteria (LAB) were evaluated, which were isolated from traditional fermented foods (rice masa, sour cassava starch and shampoos), later they were identified by 16S rRNA and the AB were evaluated using decarboxylase broth and On modified Lysine Iron Agar, positive strains were confirmed with glycerol metabolism.

Results. Diversity of microbial genera and species was found with different relative abundances in the analyzed products, the

presence of the genera *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Weissella* being common, and none of the isolates showed the ability to produce AB. **Conclusion.** None of the native species isolated from rice masate, shampoos and sour cassava starch produce AB, which is of interest to use these strains in the development of fermented foods without presenting adverse effects on human health.

Keywords: biogenic amines, amino acids, fermented foods, safety

Avaliação da produção de aminas biogênicas em bactérias lácticas isoladas de alimentos tradicionais fermentados naturalmente **Resumo**

Introdução. As aminas biogênicas (AB) são bases orgânicas nitrogenadas produto do metabolismo secundário de microrganismos em substratos protéicos, devido à atividade da aminoacil-decarboxilase favorecida por condições físico-químicas, presença, biodisponibilidade de aminoácidos e alguns cofatores. A ingestão destes pode agravar a saúde dos consumidores, manifestando-se com episódios de diarreia, até alergias graves e câncer, também são utilizados como indicadores de qualidade e higiene em alimentos fermentados. Essas características tornam necessário demonstrar a capacidade de algumas cepas nativas em produzir esse tipo de composto. **Objetivo.** Estabelecer a abundância relativa de microrganismos isolados de masate de arroz fermentado naturalmente, xampus e

amido de mandioca azedo e detectar a produção de AB. **Metodologia.** Foram avaliadas 254 espécies de Bactérias do Ácido Lático (LAB), as quais foram isoladas de alimentos fermentados tradicionais (arroz masa, amido de mandioca azedo e xampus), posteriormente foram identificadas por 16S rRNA e as AB foram avaliadas usando caldo de descarboxilase e On Modificado de Lisina Ferro Agar, cepas positivas foram confirmadas com metabolismo de glicerol. **Resultados.** Diversidade de gêneros e espécies microbianas foi encontrada com abundâncias relativas diferentes nos

produtos analisados, sendo comum a presença dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Weissella*, e nenhum dos isolados apresentou capacidade de produzir AB. **Conclusão.** Nenhuma das espécies nativas isoladas de masate de arroz, xampus e amido azedo de mandioca produzem AB, o que interessa utilizar essas cepas no desenvolvimento de alimentos fermentados sem apresentar efeitos adversos à saúde humana.

Palavras chave: aminos biogênicos, aminoácidos, alimentos fermentados, segurança.

Introducción

Las Aminos Biogénicas (AB) son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que tienen como mínimo un grupo funcional amino, su origen se debe principalmente a la descarboxilación microbiana de aminoácidos libres o proteínas, aunque también hay procesos de aminación y transaminación de aldehídos y cetonas en las que estos compuestos se generan (Cebrián A. & Sanz V., 2018). Estas bases difieren no sólo en su estructura química, naturaleza, potencial toxicológico y efectos sobre la salud, sino también sobre el papel que cumplen algunas en la regulación y el funcionamiento hormonal y neuronal de las personas, ya que, por ejemplo, algunas de estas como la epinefrina, serotonina, y dopamina, son esenciales en el funcionamiento del sistema nervioso y linfático; puesto que actúan como neurotransmisores que cumplen funciones vitales, tales como regular la frecuencia

cardíaca, contraer y dilatar los vasos sanguíneos y ayudar en la comunicación de las células nerviosas (Ladero V. *et al.*, 2010). Suelen sintetizarse de manera natural y controlada en el organismo de los seres vivos, pero cuando la concentración de algunos de estos compuestos aumenta con el ingreso de fuentes exógenas, pueden producirse efectos tóxicos en el sistema nervioso central y en el sistema gastrointestinal; generando vómito, diarrea, hipertensión, alergias severas o incluso, se puede favorecer la formación de compuestos cancerígenos como las nitrosaminas (Chang M. & Chang H., 2012).

La inocuidad de alimentos es uno de los temas de mayor importancia en la industria alimentaria, debido a que la mayoría de los consumidores evitan ingerir alimentos que resulten perjudiciales para su salud. Por lo que se sugiere un control riguroso durante el proceso de elaboración de alimentos, incluidos los fermentados, buscando

mantener la calidad higiénica de los productos en buen estado e inocuo para el consumidor. Entre los compuestos presentes en alimentos que pueden afectar la salud del consumidor, como se mencionó, podemos encontrar las AB que pueden ejercer una acción potencialmente tóxica sobre el organismo y han sido investigadas por su utilidad como indicadores de calidad de alimentos (Ruiz Capillas C. y Herrero A., 2019).

Por lo anterior, organizaciones como la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) y la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos), han establecido en diferentes productos los niveles máximos permitidos para tiramina e histamina, en valores de 40 mg/L y 50 mg/kg respectivamente. Lo anterior debido a la complejidad que presentan estos compuestos en su estructura química y las diversas concentraciones que pueden estar presentes en una amplia cantidad de alimentos, que incluyen principalmente productos pesqueros, cárnicos, lácteos, vegetales, así como productos fermentados además del vino y la cerveza; sin embargo, estas concentraciones no están permitidas para individuos con deficiencias genéticas, que no puedan sintetizar enzimas mono y diamino oxidasas, encargadas de la regulación y detoxificación de aminas exógenas (Pérez J., 2018; Díaz G., 2014).

En productos fermentados se ha presentado mayor recurrencia de este tipo de compuestos, dadas sus condiciones particulares de preparación, pH, humedad, contenido de nutrientes, materia prima y

mano de obra (Doeun D. *et al.*, 2017). Se ha identificado que varias especies microbianas que son nativas de alimentos fermentados tienen la maquinaria enzimática necesaria para descarboxilar aminoácidos y sintetizar AB como producto metabólico, algunas de estas especies pertenecen al grupo de Bacterias Acido Lácticas (BAL). De hecho, la activación de este metabolismo secundario, puede presentarse como un mecanismo de defensa al estrés que genera el medio con pH ácido, lo cual explicaría la presencia de AB como la histamina, tiramina, putrescina y cadaverina en alimentos fermentados (Linares D. *et al.*, 2012).

Puede generar curiosidad que algunas cepas de cultivos lácticos resulten ser productoras de compuestos tóxicos, de hecho, el que especies representativas de las BAL como *Lactobacillus* sp., y *Leuconostoc* sp., sean reportadas como particularmente peligrosas dada la afinidad por sintetizar aminas biógenas, y que a su vez, estas mismas sean reconocidas como especies con actividad probiótica y biotecnológica; permite inferir que la capacidad de producir AB es una característica propia de cada aislado, es decir, que las vías metabólicas que activan la producción de estos compuestos no están filogenéticamente relacionadas a nivel de género y especie sino que por el contrario esta es una propiedad intrínseca de cada cepa de cada especie particular (Barbieri F. *et al.*, 2019).

Resulta preocupante que, en algunos países, incluyendo Colombia, no se controle la presencia y los límites de estas AB en alimentos comercialmente distribuidos, aun cuando en los últimos años se ha ido

incrementando el consumo de alimentos de fermentación natural (Chaves C. *et al.*, 2014) y se han incrementado los estudios de aislamientos de microorganismos de interés tecnológico en alimentos (Motato K. *et al.*, 2017). Por esto, el objetivo de esta investigación fue establecer la abundancia relativa de microorganismos aislados de masato de arroz, champús y almidón de yuca agrio fermentados de manera natural y detectar la producción de AB implementando métodos de detección cualitativa.

Materiales y métodos

Aislamiento de microorganismos

Los microorganismos autóctonos evaluados fueron aislados de muestras de alimentos fermentados de manera natural, tradicionales en la gastronomía del suroccidente de Colombia, entre ellos masato de arroz la cual es una bebida fermentada elaborada con azúcar, clavos de olor, agua y arroz (Becerra, M. 2014) (27 muestras), champús que es una bebida a base de maíz, miel, panela, lulo y hojas de naranja (Osorio C., *et al.*, 2008) (30 muestras) y almidón de yuca agrio el cual es un producto granulado utilizado en la fabricación de productos de panadería (Chíquiza M., *et al.*, 2016) (25 muestras). Las muestras fueron recogidas en los sitios de producción ubicados los departamentos de Boyacá, Cauca y Nariño. Esta investigación se encuentra amparada por el contrato de acceso a recursos genéticos y subproductos derivados No. 0126 del 13 de mayo de 2016 expediente RGE 156-8 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la República de Colombia. Estas muestras

fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y transportadas vía aérea al laboratorio donde se realizaron los análisis. Posteriormente se descongelaron y fueron inoculadas en agar MRS (Oxoid™, EE. UU) y M17 (Liofilchem®, Italia) e incubadas a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 48 horas en condiciones microaerófilas (Vargas C. 2018). Después de ese tiempo se seleccionaron aleatoriamente aquellas colonias con diferentes morfotipos y se replicaron en el agar que inicialmente fueron aisladas. Aquellos aislados que cumplieron con la caracterización bioquímica básica: catalasa (-), oxidasa (-) y Gram (+) fueron considerados presuntivos de BAL y se crioconservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en el caldo correspondiente con 20% de glicerol.

Las bacterias que se utilizaron como control (+) y control (-), corresponden a los géneros *Salmonella* sp., y *Lactobacillus rhamnosus* respectivamente; ambas fueron suministradas del banco de cepas del grupo de investigación de Biotransformación de la Universidad de Antioquia.

Activación de los aislados

Los aislados fueron descongelados e inoculados en 5 mL del caldo de cultivo del cual fueron aislados (MRS o M17) e incubadas a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 48h en condiciones microaerófilas, posteriormente se re-inocularon en otros tubos con 5 mL del mismo caldo y se incubaron a las mismas condiciones por 12h con el fin de obtener el cultivo joven (12h) (Bleckwedel J. 2018). Las células fueron lavadas con PBS y se ajustó la suspensión celular a una Densidad Óptica (D.O₆₀₀) de

0.8 nm, que equivale aproximadamente a 2×10^9 UFC/mL (García J. *et al.*, 2018).

Identificación de los aislados de BAL

La identificación molecular de los aislados fue realizada por amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S bacteriano por el laboratorio Macrogen Inc., usando los cebadores universales: F785 (3'GGA TTA GAT CCC TGG TA 5') y R907 (5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3'). Las secuencias del ARNr 16S se compararon con la base de datos GenBank del NCBI utilizando el programa BLAST (Camacho C. *et al.*, 2009).

Los géneros y especies de BAL aisladas fueron agrupadas y presentadas en gráficos de barras y tortas respectivamente.

Evaluación de la producción de aminas biógenas

Para evaluar la producción de AB por parte de las BAL aisladas, se emplearon dos medios de cultivo diferenciales: el medio mínimo por componentes o también llamado medio descarboxilasa (**Tabla 1**) propuesto por Bover S. y Holzapfel W. (1999), con la modificación de que se adicionaron todos los aminoácidos necesarios para la síntesis de las AB evaluadas y se ajustó el pH a 5,3. Y el medio de cultivo comercial agar lisina hierro (Merck®, Colombia) suplementado con los aminoácidos L-histidina, L-ornitina, L-arginina y L-tirosina, con el fin de comparar la síntesis de AB en medio sólido y en medio líquido. Los medios fueron preparados y esterilizados a una temperatura de $115 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ por un tiempo de 15 min. Y el agar lisina hierro se sirvió aproximadamente de a 20 mL en cajas de Petri.

Tabla 1: Componentes del medio descarboxilasa propuesto por Bover S. y Holzapfel W. (1999).

Componente	Cantidad (% p/v)
Triptona	0,500
Extracto de carne	0,500
Extracto de levadura	0,500
NaCl	0,250
Glucosa	0,050
Tween 80	0,100
MgSO ₄	0,020
MnSO ₄	0,005
FeSO ₄	0,004
Citrato de amonio	0,200
Tiamina	0,001
K ₂ PO ₄	0,200
CaCO ₃	0,010
Púrpura de bromocresol	0,006
Piridoxal-5-Fosfato	0,005
Aminoácidos:	
L-histidina	0,200
L-ornitina	0,200
L-arginina	0,200

L-lisina	0,200
L-tirosina	0,200

Con el fin de definir las condiciones de temperatura para realizar los ensayos y conocer el rango de viraje del indicador de pH en los medios de cultivo, se emplearon microorganismos como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Bacillus* spp., reportadas en la literatura como productoras de aminas (Linares *et al.*, 2012) y 28 aislados de BAL seleccionados al azar. Inicialmente, estos microorganismos fueron activados en caldo BHI (Merck®, Colombia) y caldo MRS, para preparar las suspensiones celulares de cada microorganismo. Posteriormente, fueron utilizadas microplacas ELISA de 96 pozos, inoculando 25 µL de las suspensiones celulares y 225 µL del medio descarboxilasa por pozo, trabajando con un volumen efectivo de 250 µL. Cada microorganismo fue evaluado por triplicado. Bajo estas mismas condiciones, se obtuvieron tres placas ELISA que fueron incubadas a diferentes temperaturas: 25, 30 y 35 °C, y se realizaron lecturas a las 12, 24 y 48 horas.

Después de definir la temperatura y el tiempo de lectura, se procedió a evaluar la síntesis de aminas biógenas en ambos medios de cultivos para todos los aislados de BAL, utilizando microplacas ELISA de 96 pozos, inoculando las cantidades mencionadas e inoculando cada microorganismo por triplicado. Igualmente, se inocularon controles (+) y (-) en cada placa por duplicado y, además, se adicionaron 250 µL del medio de cultivo a dos pozos sin inocular, los cuales se utilizaron como control del medio para garantizar su esterilidad, las

placas fueron incubadas a 30 °C ± 2 en condiciones microaerofílicas y las lecturas fueron realizadas a las 12, 24 y 48 horas. En total fueron inoculados 30 aislados por cada placa.

De manera similar, la producción de AB en medio sólido se evaluó a través de la técnica de microgota, sembrando 10 µL de la suspensión celular de cada aislado de las BAL por duplicado en el agar lisina hierro suplementado con los aminoácidos mencionados anteriormente; igualmente, fueron empleados en el medio los controles (+) y (-). Las cajas de Petri fueron dejadas a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente fueron incubadas 30 °C ± 2 en condiciones microaerofílicas y las lecturas fueron realizadas a las 12, 24 y 48 horas. En total fueron inoculados 9 aislados por cada caja Petri.

Con el fin de eliminar los falsos positivos en la producción de AB, se realizó la prueba del metabolismo del glicerol (Gamboa R. *et al.*, 2015) en el medio descarboxilasa, en el cual se sustituye la fuente de glucosa del medio de cultivo por 0.05 g de glicerol/100 mL del medio, ajustando el pH a 5,3 y de esta manera estimular diferentes rutas metabólicas en los aislados descarboxilasa positiva, para lograr el cambio de coloración en el medio de cultivo, ocasionado por el cambio del pH. De igual manera se sirvieron en los pozos de las microplacas ELISA con 225 µL del medio de cultivo y 25 µL de la suspensión celular preparada a partir del cultivo joven (12h) de las BAL y se

incubaron $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en condiciones microaerófilas realizando lecturas cada 12, 24 y 48 horas.

En todos los medios de cultivo empleados, se interpretó como positivo el cambio del color del medio de amarillo a violeta y se interpretó como negativo cuando el medio de cultivo permaneció de color amarillo.

Resultados

Del total de los aislados fueron identificados 254 microorganismos que cumplieron los criterios básicos de identificación para BAL, de las cuales 59 fueron aisladas de masato de arroz, 47 de champús y 41 de almidón de yuca agrio y 107 aislados no lograron ser identificados. La abundancia relativa de los géneros identificados en los diversos alimentos se presenta en la **Figura 1**.

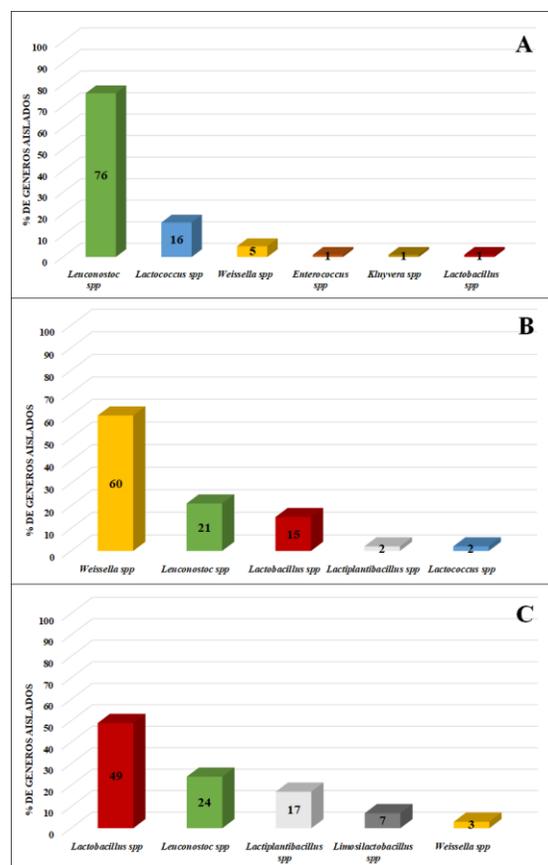


Figura 1. Abundancia relativa de los principales géneros de BAL presentes en: **A.** Masato de arroz. **B.** Champús y **C.** Almidón de yuca agrio.

De las 59 cepas aisladas del masato de arroz, se encontró que el **76%** de las BAL corresponden al género bacteriano *Leuconostoc*, seguido del género *Lactococcus* (16%) y *Weissella* (5%), sin embargo, tal y como se observa en la Figura 1A, solo se identificó el 1% de aislados de los géneros *Enterococcus*, *Kluyvera*, y *Lactobacillus*.

géneros *Lactiplantibacillus* y *Lactococcus* (**Figura 1B**).

En lo que respecta al almidón de yuca agrio, se aislaron 41 cepas de BAL de las cuales, se identificó que el género *Lactobacillus* fue el

Así mismo, en el champús fueron identificados 47 aislados de los cuales, el **60%** pertenecen al género *Weissella*, el **21%** al género *Leuconostoc*, el 15% al género *Lactobacillus* y 2% para los aislados de los

de mayor abundancia relativa correspondiente al **49%** del total de los aislados, seguido del género *Leuconostoc* con **24%**, también se identificó *Lactiplantibacillus* con 17%, *Limosilactobacillus* con 7% y el 2% restante fueron aislados del género *Weissella* (**Figura 1C**).

La abundancia relativa de las especies de los géneros identificados en los diferentes alimentos se presenta en la **Figura 2**.

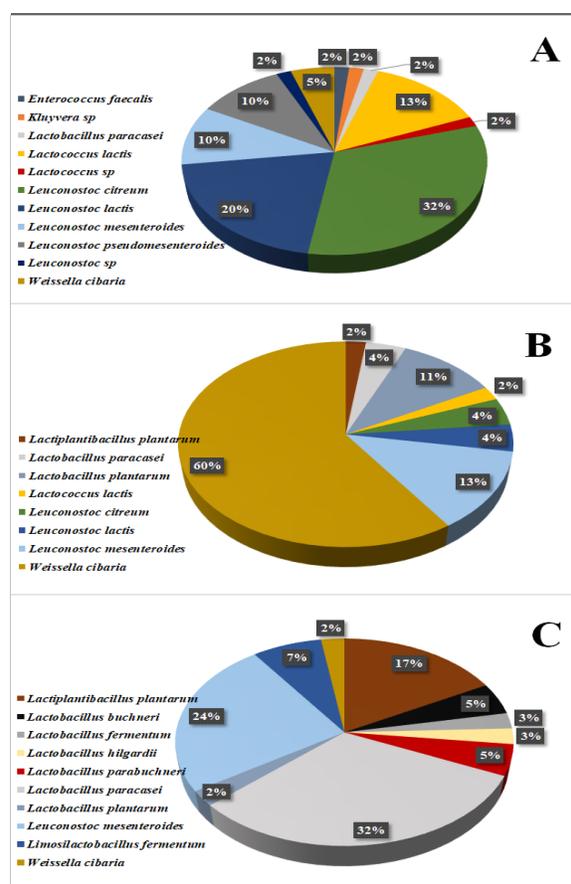


Figura 2. Especies de BAL identificadas en los alimentos: **A.** Masato de arroz. **B.** Champús y C. Almidón de yuca agrío.

De manera similar, se encontró que las especies de *Leuconostoc citreum* fueron las de mayor porcentaje de abundancia en el masato de arroz con 32% entre las especies identificadas además, se encontró 20% de la

especie *Leuconostoc lactis*, 13% de *Lactococcus lactis*, 10% de *Leuconostoc mesenteroides*, 10% de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, 5% cepas pertenecieron a la especie *Weissella cibaria*, y menos del 2% de las cepas de *Enterococcus faecalis*, *Kluyvera sp.*, *Leuconostoc sp.* y *Lactobacillus paracasei* (Figura 2A).

Igualmente, se identificó en el champús que el 60% de las especies bacterianas, corresponden a *Weissella cibaria*, también, 13% de *Leuconostoc mesenteroides*, 11% de *Lactobacillus plantarum*, 4% para cada una de las especies de *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc citreum* y *Lactobacillus paracasei*, y además 2% para cada una de las especies de *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* (Figura 2B).

Más aún, de los aislados de BAL recuperados en el almidón de yuca agrío, se encontró que el 32% pertenecía a la especie *Lactobacillus paracasei*, 24% a la especie *Leuconostoc mesenteroides*, 17% fueron aislados de la especie *Lactiplantibacillus plantarum*. También se identificó el 7% de la especie *Limosilactobacillus fermentum*, 5% para cada una de las especies *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus parabuchneri*, 3% para cada una de las especies *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus hilgardii*, y un 2% para cada uno de los aislados de *Lactobacillus plantarum* y *Weissella cibaria* (Figura 2C).

Con relación a la evaluación de las AB, algunos de los resultados de la evaluación cualitativa en las placas ELISA en el caldo de cultivo descarboxilasa para las 254 cepas

aisladas de los diferentes alimentos se presentan en la **Figura 3**.

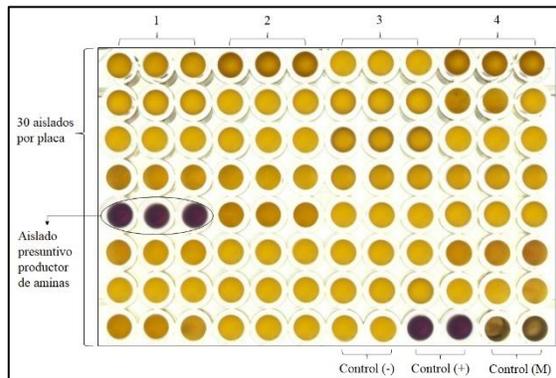


Figura 3. Determinación cualitativa de la síntesis de AB en caldo descarboxilasa empleando glucosa como fuente de carbono.

De todas las cepas analizadas, solo una cepa, aislada de masato de arroz, hizo que el medio descarboxilasa virara de amarillo a violeta, por lo que se entiende de manera presuntiva, que esta cepa tiene la capacidad para sintetizar AB. Esta positividad equivale al 0,7% de todas las cepas analizadas. Así mismo, los dos pozos correspondientes al control positivo y su duplicado viraron a violeta, mientras que el control negativo permaneció amarillo. El control del medio permaneció de color café. Esta cepa positiva se identificó como *Leuconostoc citreum* (RY135).

Al inocular los aislados en el medio de agar lisina hierro, se encontró que ninguna de las BAL aisladas del champús y del almidón de yuca agrio, tuvieron la capacidad de sintetizar AB, pero en el masato de arroz, se evidenció un cambio de coloración en el medio, para el aislado *Leuconostoc citreum* (RY135), al igual que en los resultados obtenidos para el medio descarboxilasa.

La **Figura 4** muestra la reacción de la cepa *Leuconostoc citreum* (RY135) para la

determinación cualitativa de aminas biógenas en medio sólido lisina hierro modificado.

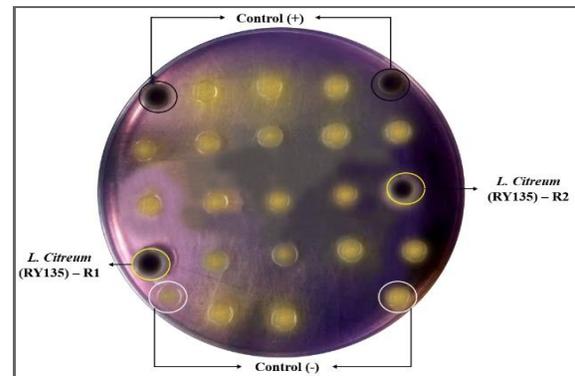


Figura 4. Determinación cualitativa de la síntesis de AB para BAL inoculadas en agar lisina hierro suplementado.

Por último, se encontró que, al emplear glicerol como fuente de carbono en el medio descarboxilasa, la cepa que inicialmente dio como presuntiva positiva en el medio descarboxilasa con glucosa, crecía, pero no causo cambio de coloración, por lo que se infiere que la cepa no sintetiza AB y, por lo tanto, se consideró esta cepa como un falso positivo. La **Figura 5** muestra la reacción de la cepa *Leuconostoc citreum* (RY135) en medio descarboxilasa suplementado con glicerol.

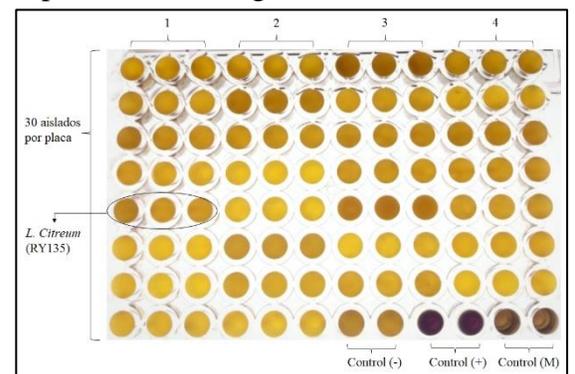


Figura 5. Determinación cualitativa de la síntesis de AB en caldo descarboxilasa empleando glicerol como fuente de carbono.

Discusión

Una de las características que se conocen de las BAL es su capacidad para crecer en entornos con condiciones desfavorables, principalmente por el estrés celular que genera la alta acidez, el pH bajo y la poca disponibilidad de nutrientes (Sáez G. *et al.*, 2018); en este sentido, las BAL son consideradas microorganismos muy competitivos, no sólo por soportar estas condiciones de estrés, sino también por su facilidad de adaptarse y excluir mediante distintos mecanismos de acción, la microbiota alterante que puede desarrollarse en alguno de sus nichos ecológicos; es así como, en algunos alimentos fermentados ya sea, de manera natural o dirigida las bacterias del ácido láctico son quienes dominan estos procesos (Bravo M., 2019).

En este estudio, tal y como se observa en la **Figura 1**, se logró aislar e identificar BAL en los tres alimentos como parte de la microbiota. Mas aún, se observaron diferencias poblacionales en los productos y se logró identificar distintos géneros y especies que predominaron en los alimentos; aunque algunos de ellos estuvieron presentes en todos, como fue el caso de los géneros *Weissella*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, existiendo diferencias entre las abundancias relativas de estos microorganismos. Resultados como estos han sido documentados en el Gari (alimentos africanos fermentados de Yuca) donde reportan la presencia en mayor proporción del género *Lactobacillus* y en menor proporción del género *Weissella*, aunque en esa ocasión no se reportó la presencia de género *Leuconostoc* (Penido, F. *et al.*, 2018).

Así mismo, se ha reportado que, en fermentaciones de arroz en China, uno de los géneros microbianos predominantes ha sido *Leuconostoc* (Zhao, C. *et al.*, 2020), lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación. En contraste con los resultados del almidón de yuca agrio y del masato de arroz, *Weissella* fue el género dominante identificado en el champús, con aproximadamente un 60 % del total de los aislados, resultados que no habían sido reportados anteriormente.

Con relación a las especies aisladas en los alimentos evaluados, también hubo diversidad con diferentes proporciones, llama la atención que la especie *Leuconostoc mesenteroides*, si bien no fue la que predominó en los productos, estuvo presente en todos ellos. Sin embargo, pese a que son varias las cepas que dominan la fermentación de este tipo de alimentos, se sabe que las especies de *Leuconostoc* sp y *Enterococcus faecalis*, son mucho más sensibles al pH en comparación con los *Lactobacillus* spp, por lo que *Leuconostoc* sp suele dominar la fermentación durante las primeras etapas y disminuir su densidad poblacional a medida que el medio se acidifica, ya que a partir de este momento las cepas de *Lactobacillus* spp son quienes continúan con la fermentación y terminan de disminuir el pH hasta concluir con el proceso (Sáez G. *et al.*, 2018).

Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, puesto que, el producto que tuvo el pH más alto, el masato de arroz con pH 5.3 fue el que presentó menor proporción de especies de *Lactobacillus*, a diferencia del almidón de yuca agrio con pH 3.8, donde se identificó mayor prevalencia de *Lactobacillus* spp, con

especies como *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. buchneri* y *L. parabuchneri*, similar a lo reportado por Penido F., (2018), aunque también se observaron en menor proporción algunas especies de *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella cibaria*. Estas observaciones permiten reafirmar que uno de los factores que limita o determina la presencia y abundancia relativa de especies de BAL en los alimentos fermentados es el pH (García, Y. *et al.*, 2008).

De manera similar, otros autores reportaron la prevalencia de especies de *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. parabuchneri*, *L. fermentum*, *L. harbinensis* y *L. paracasei* en el almidón de yuca agrio, aunque también identificaron la presencia de *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella cibaria* (Penido, F. *et al.*, 2018), lo que coincide con lo reportado en este trabajo.

Por otra parte, se encontró que, en el champús, *Weissella cibaria* fue la especie de mayor predominancia, seguida por las especies *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum* respectivamente. Anteriormente, la especie *W. cibaria* se incluía dentro de los géneros de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, por lo que, aunque haya diferencias genéticas y metabólicas que permiten diferenciarlos, son organismos que están filogenéticamente relacionados (Patel, A. *et al.*, 2013). Otros autores, han reportado la presencia de especies de *W. cibaria* en alimentos fermentados a base de vegetales como el chucrut y la mandioca (Patel A, *et al.*, 2013), así como también, se han aislado de masas madres europeas y vegetales fermentados tradicionales en la gastronomía africana y asiática (Barbieri F. *et al.*, 2019).

Aparte de esto, pese a que el champús es una bebida fermentada ampliamente consumida en áreas rurales y urbanas de Colombia y en algunos otros países de América del Sur, incluidos Ecuador y Perú, son pocos los estudios que han evaluado la predominancia de especies bacterianas en este producto, de hecho, se ha reportado la presencia de algunas cepas silvestres de levaduras en este alimento (Osorio C, *et al.*, 2008), pero hasta la fecha, no había estudios previos que evaluaran la presencia y predominancia de BAL involucradas en la fermentación del champús, por lo que los resultados obtenidos en esta investigación, plasmados en la Figuras 1b y 2b, dan una nueva información de las especies que predominan.

Con relación a la producción de AB, la cepa RY135 fue presuntamente productora de AB en los medios de cultivo descarboxilasa con glucosa y agar lisina hierro. Esto probablemente debido a que el microorganismo utiliza la glucosa durante el metabolismo primario, produciendo ácidos orgánicos que acidifican el medio de cultivo, pero que luego, durante el metabolismo secundario se pueden producir y acumular metabolitos alcalinos como el etanol (Chang M. & Chang, H., 2012), que generan un aumento en el pH; lo que lleva a tener resultados positivos en los medios de cultivo con glucosa.

Por el contrario, al emplear el medio de cultivo con glicerol, se observó que la cepa RY135 que presuntamente producía AB, no generó el cambio de color amarillo a violeta en el medio de cultivo, probablemente debido a que el microorganismo utiliza el glicerol como fuente de carbono con una producción baja de ácidos orgánicos y no

como una fuente de compuestos para la síntesis de proteínas, por ello no se producen compuestos alcalinos que neutralizan el pH del medio y no se generó la coloración violeta que confirma la presencia de AB, ya que para ello se requiere engranajes enzimáticos que participan en la producción de estos compuestos alcalinos.

Para terminar, ninguna de las especies aisladas tuvo la capacidad enzimática para producir estos compuestos, probablemente esto se deba a que la síntesis de AB no va ligada ni al género ni a la especie, sino que depende de la capacidad enzimática que cada cepa disponga en su genoma (Barbieri F. *et al.*, 2019) y de otras condiciones ambientales como el sustrato donde estas crecen, que puede favorecer la producción de estas. A diferencia de este trabajo, los estudios de Jeong D. *et al.*, (2015) y Takebe Y. *et al.*, (2016) evidenciaron que especies de *W. cibaria* aisladas del kimchi y Tofu-misozuke, fermentados tradicionales en Japón y Corea, respectivamente, tenían la capacidad de producir histamina y tiramina. Igualmente, especies de *L. curvatus* y *L. sakei* produjeron tiramina en cárnicos fermentados como salchichas o chorizos. Además, especies de *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. paracasei*, producen no solo tiramina, sino histamina en matrices cárnicas; no obstante, en productos lácteos fermentados como el queso, la producción de tiramina e histamina está dominada por cepas de *L. buchneri* y *L. parabuchneri* (Barbieri F. *et al.*, 2019).

Así mismo, varias especies de *Leuconostoc* aisladas de matrices cárnicas pueden producir putrescina exclusivamente a partir de la arginina (Candelieri F. *et al.*, 2020),

otros autores identificaron especies de *L. citreum* que tenían la capacidad de producir cadaverina en vegetales fermentados y embutidos (Jeong D. *et al.*, 2015). Todo esto conlleva a que la producción de AB se asocie con la matriz alimentaria donde crecen los microorganismos, en este caso, las matrices de las cuales fueron aislados: almidón de yuca agrio, champús y masato de arroz, tienen bajo contenido de proteínas precursoras en los sustratos, lo que puede influir en el engranaje enzimático que los microorganismos requieren.

Conclusiones

Los alimentos colombianos tradicionales fermentados poseen una gran diversidad microbiana que incluyen cepas de interés con posible potencial probiótico y tecnológico.

Las cepas aisladas de estos productos que tengan propiedades de interés biotecnológico tienen mayor seguridad para ser empleadas en el desarrollo de productos.

Además, ninguna de las especies nativas aisladas del masato de arroz, champús y almidón de yuca agrio, expresaron la maquinaria enzimática necesaria para producir aminos biógenos, lo cual resulta ventajoso si se pretenden encontrar cepas de interés tecnológico para emplearlas en el desarrollo de alimentos fermentados sin que presenten efectos adversos para la salud.

Declaración de conflictos de interés y entidades financiadoras

No hay conflicto de interés por parte de los investigadores. La entidad financiadora para la realización del presente trabajo fue MINCIENCIAS.

Agradecimientos

A los miembros del grupo de investigación de Biotransformación de la Universidad de Antioquia, maestros y demás participantes.

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto “Alimentos vegetales con funcionalidad probiótica para poblaciones infantiles desnutridas (PROINFANT)”.

Referencias

- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. *Foods*, 8(1), 17. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/foods8010017>
- Bover-Cid, S. y Holzappel, WH (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 53(1), 33-41. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00152-X)
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. y Madden, TL (2009). BLAST +: arquitectura y aplicaciones. *Bioinformática de BMC*, 10 (1), 1-9. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Candeliere, F., Raimondi, S., Spampinato, G., Tay, M. Y. F., Amaretti, A., Schlundt, J., & Rossi, M. (2020). Comparative genomics of *Leuconostoc carnosum*. *Frontiers in microbiology*, 11. Retrieved from [10.3389/fmicb.2020.605127](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.605127)
- Cebrián Aznárez, P., & Sanz Vicente, M. I. (2018). Desarrollo de tiras reactivas colorimétricas para la determinación de aminas biógenas. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza. Departamento de Química Analítica. Grupo de Biosensores Analíticos (GBA). Retrieved from <https://zaguan.unizar.es/record/76739/files/TAZ-TFG-2018-3232.pdf>
- Chang, M., & Chang, H. C. (2012). Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 269-274. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.008>
- Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: the Colombian heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1031-1048. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12098>
- Díaz González, A. I. (2014). Presencia de aminas biógenas en los alimentos. Diseño de un laboratorio para su detección y uso en el control de la calidad alimentaria. Retrieved from https://digital.csic.es/bitstream/10261/142881/1/TFG-Diaz_Gonzalez.pdf
- Doeun, D., Davaatseren, M., & Chung, M. S. (2017). Biogenic amines in foods. *Food science and biotechnology*, 26(6), 1463-1474. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0239-3>

- García, Y., Elías, A., Albelo, N., Herrera, F. R., Núñez, O., & Dieppa, O. (2008). Crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación líquida de excretas de pollos de ceba para la obtención de probióticos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(2), 195-197. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193015494014.pdf>
- Jeong, D. W., & Lee, J. H. (2015). Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. *LWT-Food science and technology*, 64(2), 1078-1084. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.031>
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., & A Alvarez, M. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145-156. Retrieved from <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>
- Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, Martín, M. C., & Álvarez, M. A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in microbiology*, 3, 180. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00180>
- Motato, K. E., Milani, C., Ventura, M., Valencia, F. E., Ruas-Madiedo, P., & Delgado, S. (2017). Bacterial diversity of the Colombian fermented milk “Suero Costeño” assessed by culturing and high-throughput sequencing and DGGE analysis of 16S rRNA gene amplicons. *Food microbiology*, 68, 129-136. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.011>
- Osorio-Cadavid, E., Chaves-López, C., Tofalo, R., Paparella, A., & Suzzi, G. (2008). Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food microbiology*, 25(6), 771-777. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.014>
- Patel, A., Falck, P., Shah, N., Immerzeel, P., Adlercreutz, P., Stålbrand, H., ... & Nordberg Karlsson, E. (2013). Evidence for xylooligosaccharide utilization in *Weissella* strains isolated from Indian fermented foods and vegetables. *FEMS microbiology letters*, 346(1), 20-28. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12191>
- Penido, F. C. L., Piló, F. B., Sandes, S. H. D. C., Nunes, Á. C., Colen, G., Oliveira, E. D. S., ... & Lacerda, I. C. A. (2018). Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. *brazilian journal of microbiology*, 49, 823-831. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.001>
- Pérez, J. P. (2018). Contenido de aminas biógenas (histamina y tiramina) y su relación con características fisicoquímicas en muestras de chicha de jora elaboradas en la provincia de Abancay, Apurímac. *Industrial data*, 21(2), 35-45. Retrieved from

<https://www.redalyc.org/jatsRepo/816/81658967005/81658967005.pdf>

Ruiz-Capillas, C. y Herrero, AM (2019). Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Food*, 8 (2), 62. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/foods8020062>

Sáez, G. D., Flomenbaum, L., & Zárate, G. (2018). Lactic acid bacteria from argentinean fermented foods: isolation and characterization for their potential use as starters for fermentation of vegetables. *Food technology and biotechnology*, 56(3), 398-410. Retrieved from <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5631>

Takebe, Y., Takizaki, M., Tanaka, H., Ohta, H., Niidome, T., & Morimura, S. (2016). Evaluation of the biogenic amine-production ability of lactic acid bacteria isolated from Tofu-misozuke. *Food Science and Technology Research*, 22(5), 673-678. Retrieved from <https://doi.org/10.3136/fstr.22.673>

Zhao, C., Su, W., Mu, Y., Jiang, L., & Mu, Y. (2020). Correlations between microbiota with physicochemical properties and volatile flavor components in black glutinous rice wine fermentation. *Food Research*

Vargas Cali, J. P. (2018). Evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja tradicional elaborado en una planta industrial y en una artesanal de la ciudad de Latacunga (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Retrieved from

International, 138, 109800. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109800>

Becerra, M. (2014). Bebidas fermentadas a partir de maíz y arroz: elaboración, control y conservación. *Alimentos Hoy*, 22(31), 96-103. Retrieved from <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/258>

Osorio-Cadavid, E., Chaves-López, C., Tofalo, R., Paparella, A. y Suzzi, G. (2008). Detección e identificación de levaduras silvestres en Champús, bebida fermentada de maíz colombiano. *Microbiología alimentaria*, 25 (6), 771-777. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.014>

Chiquiza-Montaña, L. N., Montoya, O. I., Restrepo, C., & Orozco-Sánchez, F. (2016). Estudio de la Microbiota del Proceso de Producción de Almidón Agrario de Yuca. *Información tecnológica*, 27(5), 03-14. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000500002>

Bleckwedel, J. (2018). Aspectos moleculares de producción de manitol por bacterias lácticas heterofermentativas. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10256/4892>

García, J. P., Gil, J. E., Botero, S., & Valencia, F. E. (2018). Control de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en co-cultivo con *Lactobacillus plantarum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 68-77. Retrieved from 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77064

Gamboa-Rueda, J. A., Lizcano-González, V. A., Ordoñez-Supelano, M. A., Pérez-Mendoza, J. A., Guzmán-Luna, C., & López-Giraldo, L. J. (2015). Unstructured kinetic model for batch fermentation of USP glycerol for lactic acid production. *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*, 6(1), 81-94. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-53832015000100006