



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e
Ambiente del Corso di Studi Scienze e tecnologie alimentari L

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Sviluppo di ammine biogene in vini e formaggi

Relatore

Prof. Saverio Santi

Laureanda

Erika Bassan

Matricola n. 1228715

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

Riassunto	1
Abstract	1
1. Le caratteristiche degli aminoacidi	3
1.1 Struttura degli aminoacidi	3
1.2 Classificazione degli aminoacidi	5
1.2.1 Aminoacidi non polari	5
1.2.2 Aminoacidi polari	6
1.3 Proprietà degli aminoacidi	6
2. Ammine biogene	9
2.1 Funzioni ammine biogene nel corpo	13
2.2 I microrganismi che producono ammine biogene negli alimenti	13
2.3 I prerequisiti per la formazione di ammine biogene da parte dei microrganismi	14
2.4 Sintomatologia ammine biogene	15
2.4.1. Tossicità dell'istamina	17
2.4.2. Tossicità alla tiramina	17
2.4.3. Tossicità alla putrescina	18
2.5 Limiti	18
3. Ammine biogene nel vino	21
3.1 Fermentazione alcolica e fermentazione malolattica	21
3.2 Batteri che producono ammine biogene nel vino	22

3.2.1 Produzione di istamina da parte dei batteri lattici nei vini.....	22
3.2.2 Produzione di tiramina da parte dei batteri lattici nei vini.....	23
3.3 Livelli di ammine nel vino	24
3.3.1 Limiti di istamina.....	24
3.3.2. Variazione del valore di ammine biogene durante la conservazione del vino.....	26
3.4 Fattori enologici che influenzano il contenuto di AB	27
3.5 OIV.....	29
3.5.1 Interventi nel vigneto	29
3.5.2. Interventi durante la vendemmia.....	29
3.5.3. Interventi in cantina	30
3.5.4 Operazioni di fermentazione.....	30
3.5.5. Operazioni di elevage e di chiarifica.....	30
3.6 Distinzione contenuto ammine in vini rossi e bianchi	31
4. Ammine biogene nei formaggi	33
4.1. Il latte crudo, la materia prima per la produzione del formaggio.....	33
4.2 I batteri lattici produttori di ammine biogene nel formaggio	34
4.2.1 Formazione di ammine biogene.....	35
4.3 Fattori influenti sulla produzione di ammine biogene.....	35
4.3.1 Le culture ed enzimi di avviamento.....	35
4.3.2 La pastorizzazione.....	35
4.3.3 Condizioni igieniche	36

4.3.4 Utilizzo dell'alta pressione (HHP).....	36
4.3.5 Processo di maturazione e proteolisi.....	36
4.3.6 Il pH	37
4.3.7 La temperatura	37
4.3.8 Il cloruro di sodio.....	38
4.4 Processi post-produzione.....	38
4.5. Strategie di prevenzione e controllo delle ammine	39
4.6 Il tenore di ammina biogene in diversi formaggi	39
5. Analisi per il rilevamento delle ammine nei prodotti fermentati	43
5.1 HPLC.....	43
5.2 Colorimetria.....	44
5.3 Cromatografia su strato sottile	44
5.4 Elettroforesi Capillare	44
5.5 Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction	44
6. Considerazioni finali.....	47
Bibliografia	51
Sitografia.....	55

Riassunto

Le ammine biogene sono dei composti naturalmente prodotti dal nostro organismo e compiono importanti funzioni come neurotrasmettitori, sintesi di acidi nucleici, azione vasodilatatrice e vasocostrittrice, ma possono essere assunte anche attraverso gli alimenti. Queste derivano dalla decarbossilazione di aminoacidi liberi ad opera di microrganismi con attività decarbossilasica, i quali possono essere enterobatteriacee non patogene oppure batteri lattici indispensabili per la produzione di alimenti fermentati. Le ammine se vengono introdotte in elevate quantità, possono causare dei sintomi sia a livello cutaneo come edema, pelle rossa, che emodinamici come ipertensione o ipotensione, con cefalee, nausea e vomito. Gli alimenti con un quantitativo elevato sono soprattutto i formaggi stagionati e il vino in particolare il vino rosso. Per vini e formaggi non ci sono dei limiti di legge e la quantità si misura in ppm, (parti per milione) in mg/kg. È quindi importante capire e studiare tramite analisi specifiche lo sviluppo di questi composti.

Abstract

Biogenic amines are compounds naturally produced by our body and perform important functions such as neurotransmitters, synthesis of nucleic acids and vasodilatory and vasoconstrictor action, but they can also be ingested through food. These derive from the decarboxylation of free amino acids by microorganisms with decarboxylase activity, which can be non-pathogenic Enterobacteriaceae or lactic acid bacteria essential for the production of fermented foods. If biogenic amines are introduced in high quantities, they can cause symptoms both at a cutaneous level such as edema, red skin, and at a hemodynamic level such as hypertension or hypotension, with headaches, nausea and vomiting. Foods with a high quantity are above all seasoned cheeses and wine, especially red wine. For wines and cheeses there are no legal limits, the quantity is measured in ppm, (parts per million) in mg/kg. It is therefore important to understand and study the development of these compounds through specific analyses.

1. Le caratteristiche degli aminoacidi

Gli aminoacidi (AA) sono gli elementi costitutivi delle proteine, forniscono informazioni sulla funzionalità e sulla qualità nutrizionale delle proteine. Gli AA sono assolutamente essenziali per gli esseri umani. Esistono 20 α -AA comuni, codificati dalla genetica umana e più di 700 AA meno comuni (atipici). Gli aminoacidi essendo molecole di composti organici possono formare vari collegamenti diversi tra loro a causa della natura versatile del carbonio. Ciò consente la grande diversità di proteine che si possono trovare in natura. Le proteine sono un nutriente essenziale nella nostra dieta per le funzioni che svolgono (Yates et al., 2023).

1.1 Struttura degli aminoacidi

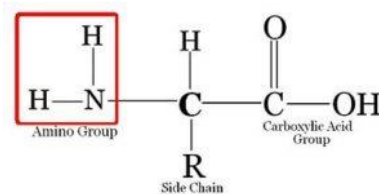


Figura 1

La struttura di base dell'aminoacido (figura 1) è uniforme.

Tutti gli aminoacidi contengono un atomo di carbonio al centro della molecola, detto alfa, che è legato a tre gruppi chimici:

Un gruppo amminico -NH₂, un gruppo carbossilico -COOH e un gruppo sostituito R variabile diverso per ogni aminoacido, che conferisce caratteristiche chimico-fisiche particolari;

i primi due gruppi possono essere neutri o ionizzati in funzione del valore del pH: in soluzione acquosa, gli AA possono presentare il gruppo acido deprotonato (COO⁻) e quello basico protonato (NH₃⁺), esiste un pH caratteristico di ogni AA, detto punto isoelettrico, al quale l'AA è presente in forma di ione dipolare (zwitterione); infine un atomo di idrogeno H.

Gli α -aminoacidi (α -AA), sono un sottogruppo di 22 aminoacidi che hanno il gruppo amminico e carbossilico legati allo stesso atomo di carbonio, chiamato α . Tutti gli α -AA, tranne la glicina, sono chirali ossia presentano la stessa struttura, ma differiscono per la posizione relativa assunta nello spazio da alcuni degli atomi o dei gruppi che li costituiscono. Queste immagini speculari sono chiamate enantiomeri, con configurazioni destrorsa (-D) e levogira (-L) a seconda di quale lato del

centro di carbonio chirale si trova il gruppo amminico. Gli α -AA, in natura, hanno tutti configurazione chirale L.

Gli AA si trovano normalmente come monomeri liberi o combinati in peptidi che, a loro volta, possono essere organizzati in proteine o segmenti di altre molecole complesse.

Gli AA proteinogenici, che costituiscono la struttura primaria delle proteine sono 22 e sono tutti L- α -AA:

1. aminoacidi essenziali (9)
2. aminoacidi non essenziali (11)
3. aminoacidi speciali (2)

Gli AA essenziali o indispensabili non sono sintetizzati o non sono sufficientemente sintetizzati nelle cellule animali per soddisfare le loro esigenze metaboliche. Dobbiamo fare affidamento su fonti alimentari (cibo e bevande) per ottenere questi aminoacidi poiché non vengono prodotti dall'organismo. Questi sono: istidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptofano (Try) e valina (Val).

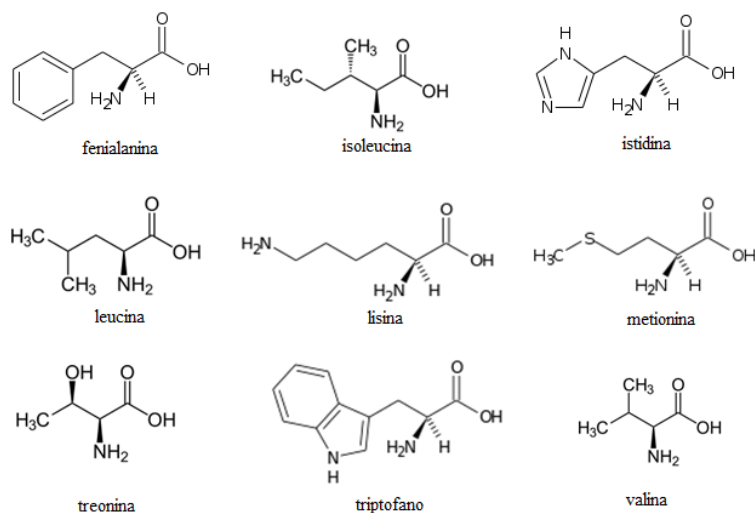


Figura 2. Visualizzazione grafica degli AA essenziali

2. I restanti 13 sono AA non essenziali (11) e speciali (2) che sono sintetizzati nel nostro corpo o sono ottenuti dalla degradazione delle proteine e non abbiamo bisogno di fare affidamento su fonti esterne per ottenerli. Questi sono: alanina (Ala), arginina (Arg), acido aspartico (Asp), asparagina (Asn), cisteina (Cys), acido glutammico (Glu), glutammina (Gln), glicina (Gly), prolina (Pro), serina (Ser), tirosina (Tyr), pirrolisina (PIL) e selenocisteina (SEC).

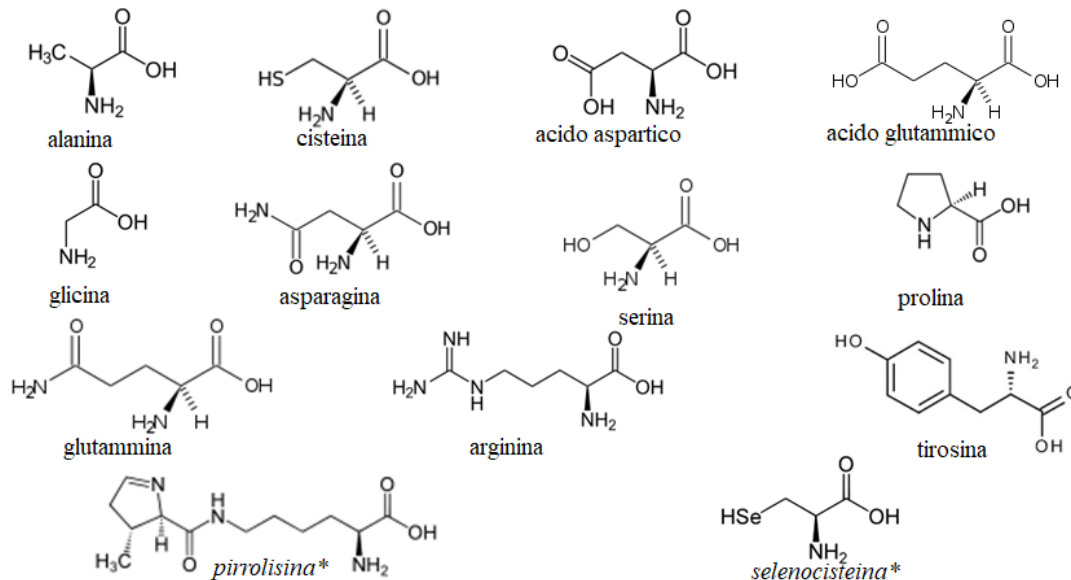


Figura 3. Visualizzazione grafica di 21 AA. Aminoacidi non essenziali in grassetto e speciali (*).

1.2 Classificazione degli aminoacidi

Gli aminoacidi possono essere classificati in base alla loro struttura e alla struttura delle loro catene laterali, ovvero le catene R. Ci sono due sottocategorie fondamentali

1.2.1 Aminoacidi non polari

Questi sono anche conosciuti come idrofobici. Il gruppo R può essere alchilico: glicina (R = H), alanina (R = CH₃), valina (R = CH(CH₃)₂), metionina (R = CH₂CH₂SCH₃), leucina (R = CH₂CH(CH₃)₂), isoleucina (R = -CH(CH₃)CH₂CH₃), aromatica fenilalanina (R = fenile) o eterociclico: prolina (R = pirrolile), (triptofano R = -CH₂-indolile).

1.2.2 Aminoacidi polari

Se le catene laterali dell'aminoacido contengono diversi gruppi polari come ammine, alcoli o acidi, sono di natura polare. Questi sono anche conosciuti come acidi idrofili. Questi sono ulteriormente suddivisi in tre categorie.

a) Acidi se la catena laterale contiene un elemento aggiuntivo di componente acido carbossilico, questi sono aminoacidi acido-polari e tendono a donare il loro atomo di idrogeno: acido aspartico ($R = CH_2COOH$) e acido glutammico ($R = CH_2CH_2COOH$).

b) Basici se hanno un gruppo di azoto in più che tende ad attrarre un atomo di idrogeno. I tre aminoacidi polari fondamentali sono: istidina ($R = CH_2$ -pirrolile), lisina ($CH_2(CH_2)_2NH_2$) e arginina ($R = CH_2$ -imidazolile).

c) Neutri se non sono né acidi né basici e hanno un numero uguale di gruppi amminici e carbossilici. Inoltre, hanno almeno un componente di idrogeno collegato ad atomi elettronegativi. Alcuni di questi acidi sono: serina ($R = CH_2OH$), treonina ($R = CH(OH)CH_3$), asparagina ($R = CH_2OHNH_2$), glutammina ($R = CH_2CH_2CONH_2$), cisteina ($R = CH_2SH$) e tirosina.

Gli aminoacidi possono anche essere classificati in base al loro fabbisogno per il corpo umano e alla loro disponibilità nel corpo umano.

1.3 Proprietà degli aminoacidi

Dopo la struttura e i tipi di aminoacidi, ci sono le proprietà degli aminoacidi.

- Ogni aminoacido ha sia un gruppo acido che un gruppo basico come si può vedere dalla sua struttura. Questo è il motivo per cui si comportano come i sali.
- Qualsiasi aminoacido allo stato secco è in forma cristallina. Esistono come ioni dipolari. Il gruppo $COOH$ dissocia in anione carbossile e H^+ , mentre il gruppo NH_2 acquista carica positiva addizionando H^+ .
- In soluzione acquosa, gli alfa aminoacidi esistono in equilibrio tra una forma cationica, una forma anionica e uno ione dipolare.

- Il punto isoelettrico è il punto di pH al quale la concentrazione degli ioni zwitterione è massima e la concentrazione della forma cationica e anionica è uguale. Questo punto è definito per ogni α -aminoacido.
- Sono generalmente solubili in acqua e hanno anche punti di fusione elevati (<https>¹).

2. Ammine biogene

Le ammine biogene (AB), dette anche bioammine, sono composti azotati basici a basso peso molecolare, prodotte da tutti gli organismi vegetali e animali e dai microrganismi e svolgono importanti funzioni biologiche. Esse si trovano in molti alimenti come formaggi e bevande fermentate come il vino. Sono formate per azione degli enzimi endogeni, ma soprattutto per azione di decarbossilasi microbiche che convertono alcuni aminoacidi liberi in ammine biogene e CO₂ (origine fermentativa) rimuovendo il gruppo carbossilico (Torriani, 2015). La rottura del legame, con la sostituzione del gruppo carbossilico con un atomo di H, provoca la perdita della chiralità del carbonio centrale. Alcune AB alifatiche sono formate dall'amminazione e dalla transaminazione di aldeidi e chetoni (Gao et al., 2023; Silla Santos, 1996).

Nella figura 4 è rappresentato il processo.

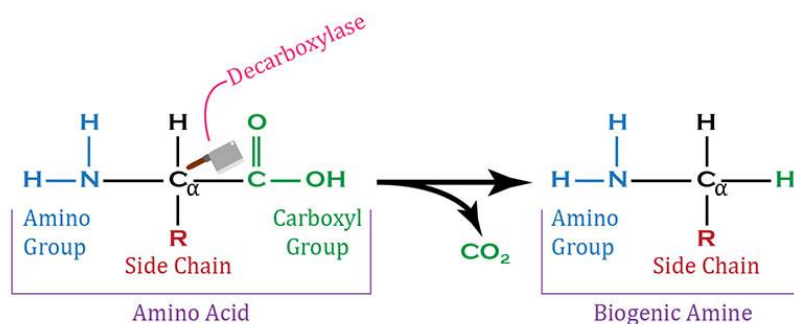


Figura 4. Processo di formazione delle AB (<https>²).

La struttura chimica delle ammine biogene può essere di tre tipi:

-alifatica (putrescina, cadaverina, spermina, spermidina); derivano dalla decomposizione della sostanza organica, da cui i nomi;

-aromatica, che a loro volta si dividono in ammine aromatiche con nucleo benzenico (tiramina e β-fenilettilamina) o eterociclico (istamina e triptamina), (Del Rio et al., 2023).

Un'altra classificazione si basa sul numero di gruppi amminici:

- le monoammine (tiramina e β-fenilettilamina),

- le diammine (istamina, triptamina putrescina e cadaverina),

- le poliammine (spermidina e spermina) la loro biosintesi e le funzioni fisiologiche sono molto diverse (Del Rio et al., 2023); sono componenti indispensabili delle cellule viventi e sono importanti per la regolazione della funzione dell'acido nucleico e della sintesi proteica, si trovano solo in concentrazioni molto basse negli alimenti e non comportano rischi per la salute (Silla Santos, 1996).

L'aminoacido decarbossilasi può essere suddiviso in decarbossilasi di aminoacidi endogeni ed esogeni. Il primo proviene da materie prime alimentari di origine animale e vegetale, ma è inattivato durante la sterilizzazione, mentre il secondo è prodotto da microrganismi durante il processo di produzione. Questa proliferazione di microrganismi che producono aminoacidi con attività decarbossilasica è la ragione principale dell'eccesso di AB negli alimenti fermentati tradizionali.

Come mostrato in figura 5, le proteine negli alimenti fermentati vengono idrolizzate in piccole quantità di peptidi e aminoacidi precursori di AB da proteasi di derivazione microbica, carbossipeptidasi e aminopeptidasi (Gao et al., 2023).

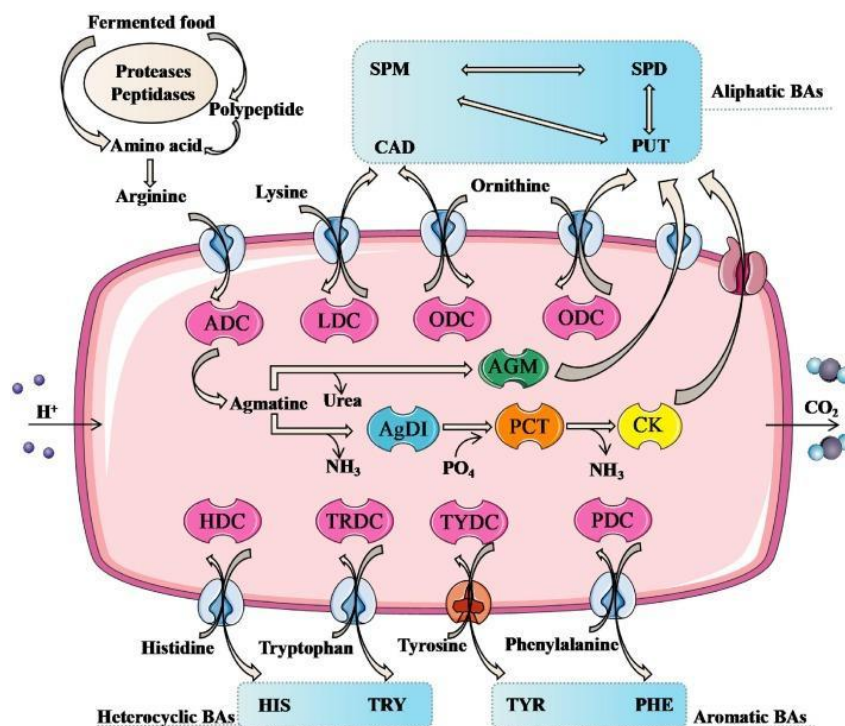


Figura 5. Meccanismi di formazione di AB negli alimenti fermentati tradizionali durante la fermentazione e la conservazione. Arginina decarbossilasi (ADC), lisina decarbossilasi (LDC), ornitina decarbossilasi (ODC), agmatinasi (AGM), agmatina deiminasi (AgDI), putrescina carbamoil

transferasi (PCT), carbammato chinasi (CK), istidina decarbossilasi (HDC), triptofano decarbossilasi (TRDC), tirosina decarbossilasi (TYDC) e fenilalanina decarbossilasi (PDC).

Con la propagazione dei microrganismi produttori di aminoacidi decarbossilasi, i microrganismi possono assorbire aminoacidi liberi, che sono decarbossilati dalla decarbossilasi dei microrganismi, formando AB nel citoplasma. Quindi le AB vengono escrete nella matrice alimentare extracellulare attraverso sistemi di trasporto attivi. Tra questi, la tirosina viene trasportata da un sistema di trasferimento unidirezionale, mentre altri aminoacidi precursori vengono trasportati nel citoplasma da un sistema anti-trasportatore proteico più efficiente (Benkerroum, 2016).

Le strutture chimiche delle AB sono mostrate nella tabella 1, da cui si può dedurre che le otto AB negli alimenti possono essere formate rimuovendo i gruppi α -carbossilici dai loro precursori. Tra le otto AB, la putrescina è unica perché ha tre diversi percorsi sintetici. Ornitina e agmatina sono i principali precursori diretti della putrescina. Negli animali e nei microrganismi (in particolare *Enterobacteria* Gram-negativi e *Pseudomonas*), la putrescina è sintetizzata principalmente dalla via dell'ornitina decarbossilasi. La via dell'arginina è la principale via di sintesi della putrescina nelle piante e nei batteri. La via dell'arginina può essere divisa in due rami: l'agmatina può essere convertita direttamente in putrescina e urea attraverso la via dell'agmatinasi (AGM) o essere degradata in putrescina e NH_3 attraverso la via dell'agmatina deiminasi (AgDI) composta da tre enzimi (AgDI, putrescina carbamoil transferasi (PCT), carbammato chinasi (CK)). A differenza di altre vie di escrezione, la putrescina prodotta dalla via AgDI viene escreta attraverso uno specifico antiporter agmatina/putrescina. La via AGM è una via biosintetica comune nelle Enterobacteriacee e nei Bacillus, mentre la via AgDI è una via biodegradativa tipica di Pseudomonas, Aeromonas e Lactobacillus. La putrescina sintetica può essere ulteriormente interconvertita con spermina e spermidina. In generale, il nome di una AB riflette quello del suo aminoacido precursore. Pertanto, l'istamina viene sintetizzata dall'istidina, la tiramina dalla tirosina, la β -feniletilamina dalla fenilalanina e la triptamina dal triptofano. Tuttavia, in alcuni casi vengono utilizzati altri nomi, come la cadaverina, che viene sintetizzata dalla lisina, e la putrescina, che viene prodotta dall'arginina. La biosintesi della putrescina è singolare poiché, oltre alla decarbossilazione, è necessaria la deaminazione (Del Rio et al., 2023).

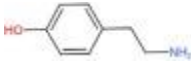
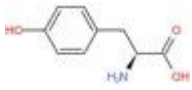
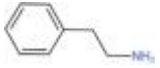
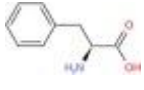
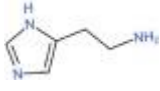
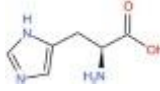
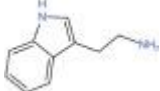
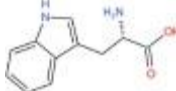

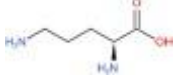

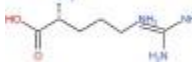

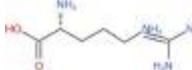

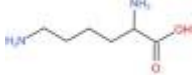
BA	Formula molecolare	Formula strutturale	Precursori	Formula molecolare	Formula strutturale
Tiramina	$C_8H_{11}N$		Tirosina	$C_9H_{11}NO_3$	
β -feniletilammina	$C_8H_{11}N$		Fenilalanina	$C_9H_{11}NO_2$	
Istamina	$C_5H_{10}N_3$		Istidina	$C_6H_9N_3O_2$	
Triptamina	$C_{10}H_{12}N_2$		Triptofano	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	
Putrescina	$C_4H_{12}N_2$		Ornitina	$C_5H_{12}N_2O_2$	
Spermidina	$C_7H_{19}N_3$		Arginina	$C_6H_{14}N_4O_2$	
Spermina	$C_{10}H_{26}N_4$		Arginina	$C_6H_{14}N_4O_2$	
Cadaverina	$C_5H_{14}N_2$		Lisina	$C_6H_{14}N_2O_2$	

Tabella 1. AB e loro strutture precursori negli alimenti.

I tipi di microrganismi coinvolti nella formazione delle AB sono diversi nei cibi fermentati tradizionali; quindi, è difficile spiegare le sostanze prodotte da percorsi multipli in un sistema alimentare complesso. È possibile studiare i meccanismi di formazione delle AB dal punto di vista del livello genico e del quorum sensing macroscopico.

2.1 Funzioni ammine biogene nel corpo

Le AB sono sostanze che vengono normalmente prodotte dall'organismo umano, dette endogene, per svolgere importanti funzioni fisiologiche, come il controllo della pressione sanguigna (Gao et al., 2023). Ad esempio, la tiramina ha un'azione ipertensiva (aumenta la pressione sanguigna) e istamina ha un'azione ipotensiva (abbassa la pressione sanguigna), la regolazione della crescita cellulare, la neurotrasmissione come l'acetilcolina che consente il passaggio dello stimolo nervoso dai nervi alla fibra muscolare, l'adrenalina, la risposta allergica (Schirone et al., 2022; Tiris et al., 2023). Inoltre, le ammine spermina e spermidina sono precursori per la produzione di acidi nucleici, ormoni, proteine e altre sostanze. L'istamina possiede una potente funzione biologica, determina sintomi riscontrati nelle risposte allergiche. Putrescina e cadaverina sono state identificate come potenziatori che aumentano la tossicità di istamina per gli esseri umani deprimendo l'ossidazione dell'istamina.

La reazione, in alcuni casi avviene in breve tempo, anche solo cinque minuti, suggerendo che l'assorbimento di almeno parte dell'ammina può avvenire attraverso la mucosa orale, scavalcando quella intestinale (Gao et al., 2023).

2.2 I microrganismi che producono ammine biogene negli alimenti

La produzione di AB è solitamente associata a:

- Enterobatteriacee, batteri Gram-negativi contaminanti, non patogeni, ceppi del genere *Escherichia coli* e alcuni *Clostridium*, questi non hanno scopo tecnologico quindi meno ce ne sono meglio è. Questi batteri Gram-negativi produttori di AB sono stati isolati anche in alimenti e bevande fermentate, per esempio nel formaggio sono state isolate le ammine cadaverina e putrescina. La crescita di batteri Gram-negativi che non dovrebbero essere presenti negli alimenti, poiché potrebbero deteriorarli o essere patogeni è inibita dal processo di fermentazione stesso. Il possibile accumulo di AB associato a questi microrganismi può essere risolto utilizzando materiali microbiologici di alta qualità e seguendo buone pratiche di produzione (Del Rio et al., 2023).

- Batteri lattici (LAB), in questo caso la situazione diventa più complessa, in quanto, quando si ha a che fare con alimenti fermentati, la biosintesi delle AB è dovuta principalmente all'azione dei batteri lattici, sono batteri Gram-positivi responsabili del processo di fermentazione stesso e delle caratteristiche organolettiche degli alimenti fermentati. Tiramina, istamina e putrescina sono le AB più comuni e abbondanti in questi prodotti, seguiti da cadaverina e β -fenilettilamina. Tali organismi

possono essere presenti nelle materie prime, far parte di colture iniziali o aggiuntive o apparire come contaminanti durante la produzione. Pertanto, dovrebbero essere sempre utilizzate materie prime di buona qualità microbiologica, le colture iniziali e aggiuntive dovrebbero essere attentamente selezionate ed evitare la contaminazione durante il processo di produzione (Linares et al., 2012). Anche la lavorazione post-maturazione (taglio e affettatura) rappresenta un'importante fonte di contaminazione da parte di batteri produttori di istamina. Per esempio, i principali batteri produttori di AB nel formaggio possono formare biofilm su superfici inerti, come l'acciaio inossidabile utilizzato nei macchinari dell'industria lattiero-casearia (Del Rio et al., 2023).

La maggior parte dei batteri produttori di istamina isolati da prodotti fermentati appartengono ai generi *Lactobacillus* e *Tetragenococcus*. Sono stati descritti anche Streptococchi produttori di istamina, Oenococchi e Pediococchi. Tuttavia, la specie principalmente responsabile dell'accumulo di istamina nel formaggio è *Lentilactobacillus parabuchneri*. Nel caso della tiramina i principali produttori appartengono al genere *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus durans* e al genere precedentemente noto come *Lactobacillus*, sebbene siano stati descritti anche alcuni appartenenti al genere *Leuconostoc*. I principali produttori di putrescine appartengono ai generi *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus* (Ladero et al., 2010).

La capacità dei LAB di produrre AB è spesso considerata una caratteristica del ceppo acquisita attraverso il trasferimento genico orizzontale, ma non è sempre così. Oltre a questi batteri sono stati descritti anche lieviti produttori di AB (*Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia jadinii* e *Geotrichum candidum*) (Del Rio et al., 2023).

2.3 I prerequisiti per la formazione di ammine biogene da parte dei microrganismi

I prerequisiti sono:

- Disponibilità di aminoacidi liberi, ma non sempre porta alla produzione di ammine.
- Presenza di microrganismi decarbossilasi-positivi
- Condizioni che consentono la crescita batterica e l'attività decarbossilasica (Silla Santos, 1996).

Gli enzimi di degradazione producono ammine biogene se si trovano ad un pH e ad una temperatura che consente loro di mantenere un'elevata attività decarbossilasica, ma incide anche il tempo di conservazione e il processo tecnologico (es. fermentazione, maturazione, cottura, pastorizzazione,

ecc.). Negli alimenti fermentati, alcuni batteri dell'acido lattico (LAB) producono AB come meccanismo di sopravvivenza contro l'ambiente acido in cui crescono. La decarbossilazione degli amminoacidi avviene più rapidamente in ambienti acidi, dove il pH varia da 4,0 a 5,5. Pertanto, la selezione di LAB utilizzati come starter costituisce un approccio fondamentale per controllare la formazione di AB (Schirone et al., 2022). Per quanto riguarda la temperatura deve essere compresa tra 20 e 37°C.

2.4 Sintomatologia ammine biogene

Il metabolismo di alcuni microbi può causare l'accumulo di AB ad alte concentrazioni in alcuni alimenti e se vengono ingerite rappresentano un pericolo per la salute dei consumatori, soprattutto di individui che hanno qualche malattia o malattia genetica (Müller et al., 2022; EFSA, 2011). Le persone che usano antidepressivi ricchi di composti inibitori delle monoamino ossidasi o quelli che hanno il meccanismo di disintossicazione delle AB carenti, sono più suscettibili all'intossicazione. Gli enzimi di degradazione delle AB (monoamino ossidasi MAO e diammina ossidasi DAO) hanno la capacità di catabolizzare le AB in eccesso, una quantità adeguata di AB non causerà danni al corpo umano. Tuttavia, la dieta contenente alte concentrazioni di AB o l'assunzione di farmaci antidepressivi contenenti inibitori dell'ammina ossidasi possono causare la disfunzione del sistema metabolico dell'ammina, influenzando le funzioni del sistema cardiovascolare, dell'apparato digerente e del sistema nervoso, portando infine a reazioni allergiche acute o addirittura alla morte. Pertanto, queste persone sono più suscettibili quando mangiano cibi con un alto contenuto di AB (Gao et al., 2023). Anche l'alcol è un potenziatore dell'effetto tossico delle AB poiché aumenta la permeabilità della parete intestinale (Wöhrl et al., 2004).

Sfortunatamente, le AB sono stabili al calore e pertanto non vengono inattivate termicamente durante la lavorazione o la preparazione degli alimenti. Il contenuto totale di AB in un corpo umano è la somma di AB endogene (cioè quelle sintetizzate dalle cellule umane e di AB esogene principalmente dal cibo e dalla biosintesi attraverso il microbiota intestinale). In condizioni normali, le AB ingerite con il cibo vengono rapidamente metabolizzate nella mucosa intestinale per produrre composti fisiologicamente meno attivi (figura 6).

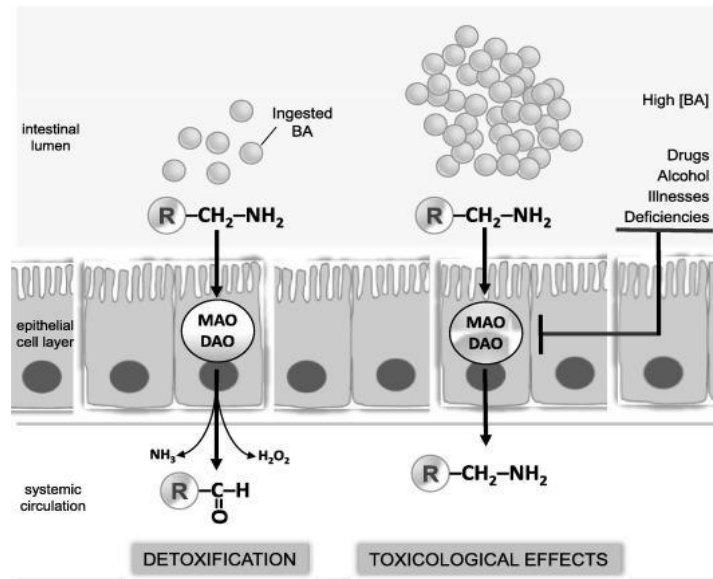


Figura 6. Metabolismo intestinale delle AB ingerite.

La principale via catabolica è l'ossidazione, questa reazione è catalizzata da specifiche amino ossidasi classificate come mono o diammina ossidasi (rispettivamente MAO e DAO) a seconda del numero di gruppi amminici posseduti dal substrato. Le MAO sono ulteriormente classificate in MAO-A e MAO-B a seconda del tessuto in cui si trovano e delle loro affinità specifiche per substrati e inibitori. La MAO-A deamina la serotonina nel sistema nervoso centrale e le monoamine alimentari nell'epitelio intestinale. La MAO-B si trova principalmente nel fegato e nei muscoli e deamina la dopamina e la β -fenilettilamina.

La DAO è responsabile della disattivazione dell'istamina e della putrescina nel tratto gastrointestinale. A volte, però, le AB ingerite con il cibo possono interagire con recettori specifici e indurre disturbi digestivi, circolatori e respiratori. La gravità dei sintomi clinici dipende dalla quantità e dalla varietà di AB ingerite e dalla suscettibilità individuale, che a sua volta dipende dall'attività degli enzimi disintossicanti.

I sistemi di disintossicazione possono eliminare efficacemente le basse concentrazioni di AB. Tuttavia, quando la concentrazione di AB è elevata e MAO e DAO si saturano, le AB non metabolizzate possono passare nel flusso sanguigno e causare intossicazioni (Del Rio et al., 2023).

Ci sono vari effetti tossici delle AB, i più intossicanti sono dovuti dall'istamina e dalla tiramina (Tiris et al., 2023).

2.4.1. Tossicità dell'istamina

Attualmente, le amministrazioni sanitarie internazionali considerano l'intossicazione da istamina uno dei principali problemi della sicurezza alimentare globale, sia per i suoi effetti sulla salute umana che per il suo impatto sul commercio (OMS, 2018). I sintomi possono essere di tre tipologie e sono strettamente legati alle funzioni fisiologiche di questa AB:

- colpiscono la pelle (determinando arrossamento, eruzione cutanea tipiche delle allergie, orticaria, prurito, edema e infiammazione locale);
- il tratto gastrointestinale (determinando nausea, vomito e diarrea);
- il sistema circolatorio e sistema nervoso (determinando ipotensione, mal di testa, palpitazioni e formicolio) (Del Rio et al., 2023) e crampi addominali (Müller et al., 2022).

Poiché l'istamina viene normalmente rilasciata dalla degranolazione dei mastociti in risposta ad una reazione allergica, il consumo di alimenti contenenti alte concentrazioni di istamina può avere lo stesso effetto. Nei casi più gravi, se il trattamento con antistaminici non è garantito, può verificarsi la morte per broncospasmo, distress respiratorio e shock vasodilatatore (Schirone et al., 2022).

La somiglianza sintomatica tra intossicazione e allergia da istamina significa che la prima è sotto diagnosticata. In termini di incidenza, i dati più recenti diffusi dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie mostrano che, nel 2017, si è registrato un aumento del 22% dei focolai di intossicazione da istamina rispetto al 2016 (EFSA e ECDC., 2018).

2.4.2. Tossicità alla tiramina

La tiramina è un'ammina presente in tracce, causa ipertensione, mal di testa, febbre, vomito e sudorazione (Tiris et al., 2023). La tiramina non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, per cui ha solo effetti simpaticomimetici periferici non psicoattivi esercitati attraverso la via che coinvolge i neuroni della rete vagale. Alti livelli di tiramina nel cervello, tuttavia, sono stati associati a disturbi neurologici come la schizofrenia, il morbo di Parkinson, la sindrome di Reye e la depressione. Ciò potrebbe essere correlato a recenti scoperte che suggeriscono che la tiramina potrebbe raggiungere il sistema nervoso centrale dopo il pasto.

Quando si consuma cibo contenente tiramina, questa raggiunge l'intestino dove viene disintossicata dalle MAO. Tuttavia, se la quantità di tiramina ingerita è troppo elevata, o qualcosa inibisce l'attività delle MAO, la tiramina in eccesso raggiungerà il flusso sanguigno e interagirà con i recettori TAAR "Recettori Associati alle Ammine in Tracce", causando vasocostrizione e quindi aumento della pressione sanguigna (Del Rio et al., 2023).

2.4.3. Tossicità alla putrescina

La putrescina fu descritta per la prima volta nel 1885 da Ludwig Brieger, che la isolò da un cadavere in decomposizione. Gli effetti tossici della putrescina sono considerati meno potenti di quelli dell'istamina e della tiramina, favoriscono l'assorbimento intestinale e/o ne ostacolano la disintossicazione, inibendo gli enzimi (monoamine o diammine ossidasi e N-metiltransferasi) coinvolti nella biodegradazione ossidativa. Alcuni effetti sono ipotensione, bradicardia ed episodi di paralisi degli arti. L'interazione con gli inibitori delle MAO aumenta il rischio di ipertensione (Tiris et al., 2023).

La quantità di AB, nei prodotti alimentari è importante come indicatore di qualità e salubrità degli alimenti. Anche la concentrazione nel plasma umano e nelle urine sono indicatori critici che mostrano l'esposizione alle AB. Pertanto, sono sempre necessari metodi analitici sensibili, semplici, veloci e a costi ridotti (Tiris et al., 2023).

2.5 Limiti

L'unica legislazione che regola le AB negli alimenti è quella riguardante l'istamina, ma solo per pesce e i derivati, ad esempio, nell'Unione Europea attraverso il Regolamento CE 2073/2005 (Commissione Europea, 2005), e negli USA attraverso le linee guida politiche della FDA (Food and Drug Administration 2022).

È difficile stabilire un limite generale di sicurezza per le AB nei prodotti alimentari (EFSA, 2011). I livelli approvati e i livelli tossici sono diversi per ciascuna AB e per alcune di esse non ci sono dati. Inoltre, i limiti tossici possono essere diversi per ogni persona a causa di intolleranze alimentari, caratteristiche allergiche, fattori genetici e assunzione di alcuni farmaci che inibiscono l'attività degli enzimi. Gli effetti tossici variano anche dal tipo di matrice alimentare. Ad esempio, è stato dimostrato che gli alimenti ricchi di grassi e proteine riducono la capacità di assorbire le AB come la tiramina, mentre l'alcol aumenta la permeabilità dell'intestino alle AB. Inoltre, gli effetti tossici delle diverse

AB sono stati generalmente studiati individualmente, sia nell'uomo che negli animali da esperimento o in modelli in vitro, senza considerare che la tossicità di una può essere influenzata dalla presenza di un altro. Nei formaggi è relativamente comune la presenza simultanea di diverse AB in alte concentrazioni, che possono influenzare notevolmente i loro effetti tossici dopo l'ingestione.

Alcuni studi hanno riportato livelli tossici minimi per alcune AB. Per l'istamina è stato riportato (Wöhrl et al., 2004) che l'assunzione di 50 mg non causa sintomi, non provoca effetti negativi a persone sane, mentre 75 mg di istamina orale pura liquida (una dose comune nei pasti normali) provocano sintomi lievi sia immediati che ritardati nel 50% dei soggetti sani, valori superiori a 100 mg inducono sintomi di un'intolleranza all'istamina mentre l'ingestione di alimenti contenenti 400 mg di istamina è considerata pericolosa, infine l'ingestione di alimenti contenenti 1000 mg può causare grave intossicazione. Questi valori, in particolare il valore di 50 mg di istamina al quale non si osservano effetti tossici, sono stati utilizzati dall'EFSA per sviluppare un modello di quantificazione del rischio effettuando studi in vitro, con linee cellulari dell'epitelio intestinale umano. Questo modello indica che il consumo di cibi crudi con concentrazione d'istamina $<200 \text{ mg kg}^{-1}$ o $<400 \text{ mg kg}^{-1}$, non presentano rischi per la maggior parte dei consumatori, mentre concentrazioni superiori a 441 mg kg^{-1} sono citotossiche e quindi rappresentano un rischio per la salute umana. Queste concentrazioni possono essere raggiunte nei formaggi (Del Rio et al., 2023).

Secondo la FDA (Food and Drug Administration), il limite massimo consentito di istamina in un alimento è di 500 mg/kg. Per quanto riguarda la tiramina, gli effetti tossici si manifestano dopo l'ingestione orale e sono stati confermati in diversi studi dose-effetto. Secondo l'EFSA (2011), un'assunzione di 600 mg per pasto non dovrebbe essere superata nei soggetti sani e questa quantità dovrebbe essere ridotta nei pazienti che assumono farmaci inibitori delle monoamino ossidasi IMAO (Schirone et al., 2022). È stato determinato che la somministrazione orale di 125 mg di tiramina ha esercitato effetti sulla pressione sanguigna in individui sani. Se la dose somministrata di tiramina fosse aumentata a 500 mg, la pressione sistolica basale sarebbe aumentata di almeno 30 mmHg. In alcuni individui, l'eccesso di tiramina può innescare valori di pressione sanguigna sistolica di 180-200 mmHg, sufficientemente alti da causare una crisi cardiaca. Fortunatamente, i MAO inibitori di nuova generazione (inibitori reversibili delle MAO-A) non inducono una sensibilità così elevata. I pazienti trattati con questi nuovi MAO inibitori possono tollerare l'ingestione di 50 mg di tiramina, alcuni riescono fino a 150 mg. Studi in vitro condotti su cellule epiteliali intestinali umane hanno

dimostrato che la tiramina è citotossica (tossica per le cellule) alle concentrazioni presenti negli alimenti ricchi di AB. Questo effetto è causato dalla morte cellulare tramite necrosi.

L'intossicazione da tiramina provoca la cosiddetta “reazione al formaggio”, che è principalmente associata al consumo di questo alimento e può causare emicrania indotta dalla dieta. Concentrazioni di tiramina comprese tra 100 e 800 mg kg⁻¹ sono state considerate accettabili negli alimenti fermentati (Barbieri et al., 2019).

Per la putrescina ci sono pochi dati sulle relazioni dose-effetto, poiché è meno tossica (Del Rio et al., 2019). Un singolo studio sull'ingestione giornaliera di alimenti e sul loro contenuto medio di putrescina suggerisce di fissare un limite di 180 mg kg⁻¹ per il formaggio alimento in cui sono state registrate le concentrazioni più elevate (EFSA, 2011). Più recentemente, il lavoro sulla citotossicità in vitro di questa AB ha dimostrato che alle concentrazioni riscontrate in alimenti come i formaggi causava necrosi.

Rauscher-Gabernig et al., hanno proposto livelli massimi tollerabili di 180 e 540 mg kg⁻¹ rispettivamente per putrescina e cadaverina nei formaggi. Alte concentrazioni di putrescina, spermidina e spermina possono persino causare lo sviluppo di tumori, poiché reagiscono con i nitriti per formare nitrosammine cancerogene (Tiris et al., 2023).

Dato il fatto che diverse AB sono comunemente presenti negli alimenti (EFSA 2011) è stata proposta una concentrazione totale massima di AB negli alimenti pari a 750–900 mg kg⁻¹ (Ladero et al., 2010; Silla Santos, 1996). È stata dimostrata una tossicità sinergica della tiramina e dell'istamina nei confronti delle colture cellulari intestinali. In particolare, mostrano diversi effetti citotossici caratterizzati dalla morte cellulare programmata dall'istamina e dalla necrosi cellulare diretta causata dalla tiramina. Sembra che quest'ultimo evento faciliti l'accesso dell'istamina nelle cellule, aumentandone la tossicità (Schirone et al., 2022).

3. Ammine biogene nel vino

Nel vino, la produzione di AB è abbastanza inevitabile e la presenza rappresenta un problema per i consumatori e per i produttori dal momento che l'assunzione di dosi eccessive di questi composti ha effetti tossici sull'organismo umano e costituisce un rischio per la salute.

Nel vino si possono trovare circa 25 ammine biogene, ma quelle più frequenti sono: istamina e tiramina, dotate di maggiore tossicità e putrescina, β -fenilettilamina e cadaverina che pur non essendo di per sé molto tossiche, potenziano gli effetti delle altre AB. Le AB presenti nei mosti rappresentano circa un terzo delle AB presenti nel vino finale.

Come detto in precedenza, una quantità limitata di AB non è dannosa per la salute, poiché l'organismo umano riesce ad eliminarle attraverso appositi sistemi. Tuttavia, se ingerite in dosi elevate o se il sistema detossificante naturale dell'organismo è inibito per la presenza di aldeidi, etanolo o certi farmaci, si possono manifestare vari effetti tossici e reazioni allergiche che sono funzione della tipologia di AB e della sensibilità individuale. In particolare, la presenza dell'etanolo che si trova nel vino, svolge un'azione inibitrice su alcuni enzimi intestinali e riduce la soglia tossicologica delle ammine in quanto interagisce con i processi di detossificazione, instaurando una condizione di concorrenza per la quale gli enzimi amino-ossidasi operano con difficoltà e rilasciano nel circolo sanguigno le AB senza trasformarle in prodotti innocui per l'organismo umano (Torriani, 2015).

3.1 Fermentazione alcolica e fermentazione malolattica

Le AB si accumulano nel vino dopo la fermentazione, può essere fermentazione alcolica o fermentazione malolattica (FML) e sono attribuibili principalmente all'attività decarbossilasica dei batteri lattici sugli aminoacidi precursori.

Dopo la fermentazione alcolica si trasformano gli zuccheri presenti nel mosto in alcol grazie all'azione dei lieviti *Saccharomyces cerevisiae*, i quali modificano la composizione del mosto d'uva iniziale in composti azotati utilizzando alcuni aminoacidi e secernendone altri. Dopo la fermentazione alcolica, avviene una seconda fermentazione, la fermentazione malolattica dove si verifica la decarbossilazione del L-malato in L-lattato da parte dei batteri lattici (LAB). Questo ha effetti significativi sulla disacidificazione e sui composti che influenzano il sapore e sulla stabilità della fermentazione. Vediamo nel dettaglio gli effetti organolettici della malolattica sui vari tipi di vino. È maggiormente utilizzata nei vini rossi ma recentemente è stata introdotta anche nei vini bianchi più

importanti. Non viene eseguita nei vini bianchi più giovani e freschi generalmente caratterizzati da maggiore acidità. Questa fermentazione secondaria è difficile da controllare ed è guidata principalmente dal batterio lattico *Oenococcus oeni*.

Tuttavia, si sviluppano altre specie di batteri lattici e vengono metabolizzati altri substrati che inducono i cambiamenti sensoriali favorevoli richiesti durante la vinificazione o eventualmente reazioni indesiderate.

Dopo la fermentazione malolattica il vino viene solfitato, quindi viene aggiunta bisolfito che produce anidride solforosa (SO₂) per eliminare lieviti e batteri non più desiderabili. È ovvio che l'anidride solforosa non arresta completamente tutte le reazioni biochimiche innescate dai batteri, a causa del pH elevato. La SO₂ è meno attiva ed è accentuata nei vini rossi a causa della sua combinazione con i polifenoli. (Lonvaud-Funel et al., 2001; Soufleros et al., 1998). La pratica dell'inoculo o del co-inoculo dei batteri selezionati, è sicuramente da considerare tra le tecniche che meglio rispondono al corretto svolgimento della fermentazione malolattica minimizzando la produzione di AB. L'aggiunta di lisozima appare tecnicamente efficace ad inibire le attività dei batteri lattici. Trattandosi di un derivato dell'uovo, la sua presenza nei vini va però segnalata in etichetta ai sensi del Reg. UE 1169/2011.

Alla fine della fermentazione alcolica, la concentrazione di AB è inferiore e aumenta durante la FML, questo dipende dal ceppo batterico utilizzato e il contenuto è più elevato in caso di fermentazione malolattica spontanea (<https>³, <https>⁵).

3.2 Batteri che producono ammine biogene nel vino

3.2.1 Produzione di istamina da parte dei batteri lattici nei vini

È importante garantire la sicurezza microbiologica e la qualità del vino, per questo bisogna conoscere la composizione microbica. Le specie maggiormente coinvolte nella produzione di istamina nel vino sono *Oenococcus oeni* e *Pediococcus damnosus* (Torriani, 2015).

Nella vinificazione, la specie *O. oeni* domina durante la fermentazione malolattica, tuttavia, molti ricercatori hanno considerato questa come la specie responsabile della produzione d'istamina nel vino. Tuttavia, questa conclusione potrebbe non essere l'unica spiegazione sulla presenza d'istamina nel vino poiché esistono altre specie di batteri lattici che sono stati isolati dal mosto, durante ed alla

fine della FML. Questi sono *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus brevis* (Garcia-Moruno e Muñoz, 2012).

L'isolamento dei ceppi dai vini ha dimostrato che alcuni ceppi di *O. oeni* possono decarbossilare l'istidina per la produzione di istamina. L'istamina è tra le ammine biogene che si trova più frequentemente nei vini rossi rispetto ai vini bianchi, dovuta alla fermentazione malolattica.

Per un dato ceppo la produzione di istamina è aumentata nelle condizioni di crescita più sfavorevoli, cioè in mancanza di substrati fermentabili come zucchero e acido malico. Questo suggerisce che la decarbossilazione dell'istidina può essere utilizzata come meccanismo aggiuntivo per la generazione di energia in cellule private di altri substrati. Questo spiega anche perché la concentrazione di istamina aumenta, anche dopo la fermentazione malolattica, quando la maggior parte delle fonti energetiche sono state metabolizzate. Il fenomeno è accentuato se la macerazione, o la conservazione con le fecce di lievito è prolungata, poiché dall'autolisi del lievito è disponibile più istidina, ossia il substrato.

La ricerca sul ceppo *O. oeni* IOEB 9204, uno dei ceppi produttori di istamina isolati da un vino, ha portato alla caratterizzazione dell'attività dell'istidina decarbossilasi (HDC). È un enzima allosterico, con una struttura quaternaria e con un elevato grado di cooperatività, per cui quando la concentrazione di istidina aumenta, è favorito il legame al sito attivo. L'istamina è un inibitore competitivo. Gli acidi citrico e L-lattico hanno anche effetti inibitori sull'attività dell'HDC sia per le cellule intere che per l'estratto privo di cellule. Tuttavia, l'acido citrico viene fermentato dai batteri durante la fermentazione malolattica, mentre l'acido L-lattico si accumula nel vino a seguito della decarbossilazione dell'acido malico (Lonvaud-Funel et al., 2001).

Normalmente l'istamina viene degradata senza problemi dopo l'assorbimento dal cibo. Tuttavia, vi sono persone che reagiscono con sintomi drastici a piccole quantità, determinando una malattia chiamata "intolleranza all'istamina". Le persone che soffrono di questa malattia dipendono da diete a basso contenuto di istamina, per questo l'istamina è un contaminante indesiderato nel vino (Gafner, 2003).

3.2.2 Produzione di tiramina da parte dei batteri lattici nei vini

I batteri lattici responsabili della produzione di tiramina sono lattobacilli etero fermentanti, come *Lactobacillus brevis* e *L. hilgardii*. viene prodotta durante la fermentazione alcolica.

In generale si può dire che numerosi studi hanno evidenziato che la capacità decarbossilasica dei batteri lattici non è tipica di una specie ma è ceppo-specifica (Torriani, 2015).

3.3 Livelli di ammine nel vino

I livelli medi delle diverse AB nel vino sono dell'ordine di qualche mg/L o di qualche decina di mg/L. Alti livelli di AB possono anche avere effetti negativi sulla qualità sensoriale del vino in quanto possono mascherare alcune note aromatiche: con livelli >100 mg/L si possono avere sentori metallici, di carne o putridi. Nonostante la presenza di AB sia un fenomeno diffuso non esiste una legislazione che fissi i valori limite per queste sostanze; tuttavia, alcuni paesi europei hanno raccomandato di limitare la concentrazione di alcune ammine.

3.3.1 Limiti di istamina

Per l'istamina sono stati determinati dei valori massimi compresi tra 2 e 10 mg/L, a seconda del paese, il limite superiore raccomandato è 10 mg/L. (Tabella 2). Un vino può essere considerato esente da istamina solo se non ne contiene più di 0.5 mg /L. (Gafner, 2003). Attualmente non esiste un limite legale in nessun paese per il contenuto d'istamina nel vino (Garcia-Moruno e Muñoz, 2012).

PAESE	ISTAMINA mg/L
Austria	10
Svizzera	10
Francia	8
Paesi Bassi	3
Belgio	5/6
Germania	2

Tabella 2. Livelli di istamina in alcuni Paesi Europei (Torriani, 2015)

I vini prodotti con fermentazioni spontanee possono contenere livelli elevati di AB come mostrato in Tabella 3, dove i livelli di istamina rilevata supera ampiamente i limiti massimi imposti dai vari Paesi europei e la quantità di AB totali va oltre i 25 mg/L.

Vino	Alcol etilico (%vol)	Cadaverina	Istamina	Putrescina	Ammine biogene totali
Garganega del Veneto 2009	12.5	0.64	6.36	13.73	25.10
Merlot del Veneto IGT 2009	13.5	0.76	7.16	17.52	29.54
Rosso del Veneto 2009	12.5	1.02	11.60	31.08	49.63
Rosso del Veneto IGT 2008	15.5	0.37	18.36	28.25	50.23

Tabella 3. Valori di AB nei vini rossi (Torriani, 2015, [https⁴](#)).

Sarebbe importante evitare la fermentazione spontanea ad opera di microrganismi indigeni, soprattutto se la composizione dei mosti presenta aspetti di criticità, curando al meglio i processi fermentativi, anche attraverso una corretta alimentazione dei lieviti. In questo modo si potrà minimizzare la presenza di accettori della anidride solforosa, preservandone la frazione molecolare attiva sui microrganismi indesiderati (Torriani, 2015).

Le AB nel vino possono causare deterioramento. Per garantire un metodo di conservazione sicuro per la salubrità dei prodotti vitivinicoli, i livelli di AB possono essere un importante indicatore di qualità e sicurezza. Pertanto, dovrebbero essere compiuti sforzi per evitare la formazione di ammine, scegliere con attenzione il ceppo di batteri da impiegare nella fermentazione malolattica, privilegiando quelli che presentano una bassa formazione di ammine biogene, cioè una bassa capacità decarbossilante, in grado di competere con i batteri indigeni. Ci sono poi altre condizioni che aumentano il tenore in ammine biogene e che quindi vanno tenute sotto controllo, come elevati valori di pH e una scarsa igiene in vinificazione ([https³](#)).

Per quanto riguarda il pH è il fattore più importante che determina l'attività biologica dei batteri nel vino. Più alto è il pH, più complessa è la microflora batterica, perché agisce come fattore selettivo dei microrganismi nel vino e le ammine biogene vengono prodotte in elevate quantità (Lonvaud-Funel et al., 2001). Non è raro che il valore del pH sia superiore a 3,5 e che la FML sia condotta da diversi batteri invece che dal solo *O. oeni*. Lopez et al. (2012) e Wang et al. (2014) hanno scoperto che tutti

i vini con pH superiore a 3,7 contenevano livelli relativamente elevati di AB. Tuttavia, la FML è più difficile nei vini con un pH inferiore a 3,2.

I lieviti hanno la capacità di modificare la composizione amminoacidica del vino, modulando i precursori oggetto dell'attività dei batteri lattici. La decarbossilazione degli aminoacidi è un'attività vantaggiosa per questi batteri perché da questa trasformazione ricavano energia e la tolleranza dei batteri all'ambiente acido viene facilitata grazie alla produzione di composti basici che aumentano il pH del mezzo.

3.3.2. Variazione del valore di ammine biogene durante la conservazione del vino.

Il contenuto di AB può essere modificato durante la conservazione del vino. Diversi studi mostrano l'evoluzione del profilo delle AB nel tempo durante l'invecchiamento in botte. Tuttavia, il consumatore potrebbe essere più esposto alle AB una volta che la bottiglia viene aperta. Esiste un solo studio che analizza l'evoluzione delle AB nelle bottiglie di vino aperte in cui hanno studiato l'evoluzione del profilo delle AB nel vino bianco e nel vino rosso di due qualità, standard e di alta qualità, per dieci giorni, in diverse condizioni di conservazione, tipo di tappo e utilizzo di dispositivi di vuoto (Palomino-Vasco et al., 2019).

Durante lo stoccaggio delle bottiglie di vino aperte alle diverse condizioni, sono state osservate lievi variazioni nel profilo delle ammine biogene e del pH.

Nel vino rosso di qualità standard, la quantità totale di ammine biogene ha mostrato una tendenza a diminuire nel tempo, indipendentemente dalle condizioni di conservazione. Questa tendenza si osserva principalmente nella concentrazione di istamina, che è diminuita significativamente dal quarto al decimo giorno, e in misura minore di cadaverina. Tuttavia, la feniletilamina e spermidina sono aumentate significativamente nel tempo in tutte le condizioni, ma le loro quantità sono così basse che non influenzano le concentrazioni totali.

Per quanto riguarda il vino rosso di alta qualità, sono state riscontrate alcune differenze tra le diverse condizioni di conservazione. I campioni che non sono stati tenuti sottovuoto hanno mostrato una tendenza a diminuire nel tempo, mentre i vini tenuti sottovuoto non hanno mostrato cambiamenti significativi nelle concentrazioni totali di ammine biogene. Queste differenze sono dovute principalmente alla tiramina e all'istamina che sono diminuite nel tempo in tutte le condizioni. Per

quanto riguarda la cadaverina, si evidenzia il suo aumento dal quarto al decimo giorno con o senza vuoto.

A differenza dei vini rossi, il vino bianco non ha mostrato una variazione chiara e significativa nel contenuto totale delle ammine biogene. Sebbene le concentrazioni delle diverse ammine siano molto più basse, si osserva un aumento delle concentrazioni di istamina dal quarto giorno in tutte le condizioni, al contrario dei vini rossi.

In generale, l'evoluzione delle ammine biogene nei tre tipi di vino non ha mostrato una chiara tendenza comune. In conclusione, si può dire che la concentrazione di istamina è diminuita in entrambi i vini rossi ma è aumentata nel vino bianco.

Questo lavoro conclude che le bottiglie di vino aperte e tenute in diverse condizioni di conservazione non hanno mostrato un importante aumento delle concentrazioni di ammine biogene. Il profilo delle ammine biogene è leggermente cambiato nel tempo nei tre tipi di vini, ma la concentrazione finale di queste biomolecole è determinata principalmente dalle loro quantità iniziali. Nell'ordine, l'istamina e la putrescine, erano le AB più abbondanti, ma le loro concentrazioni non erano sufficienti per causare intossicazione alimentare (Ordóñez et al., 2017).

La produzione di vino con un contenuto ridotto di AB è una preoccupazione mondiale e il progetto europeo BiamFood (Comunità Europea, 2011) afferma che il controllo delle ammine biogene nei prodotti alimentari ridurrà il rischio ai consumatori, prevenendo problemi sanitari. Questo sarà raggiunto formulando guide sulle migliori pratiche, sviluppando strumenti e utilizzando nuovi batteri lattici iniziali (<https>⁶).

3.4 Fattori enologici che influenzano il contenuto di AB

La variabilità nel livello di AB nel vino è influenzata da diversi fattori; materie prime, disponibilità di aminoacidi liberi nell'uva, grado di maturità, fertilizzazione azotata del terreno, irrigazione, condizioni climatiche, macerazione successiva alla fermentazione, grado di autolisi, presenza di muffe sull'uva, contenuto alcolico, crescita di popolazioni microbiche, pH elevato del mosto e sviluppo di certi lieviti al momento della fermentazione alcolica, temperatura, volume di anidride solforosa, torbidità e acidità volatile. Queste influenzano la tipologia e l'entità delle popolazioni microbiche e le loro attività metaboliche. Il contenuto di AB nel vino dipende dai processi coinvolti nella vinificazione, ossia durante le diverse fasi di produzione (Palomino-Vasco et al., 2019).

In generale, alcuni di questi fattori possono aumentare direttamente il livello di aminoacidi precursori mentre altri preferiscono lo sviluppo di ceppi con decarbossilasi. Una cosa da tenere presente è che il tenore di ammine biogene non varia in funzione della concentrazione di zucchero negli acini. I processi di lavorazione, di confezionamento e le proprietà fisiche dei materiali alimentari possono influenzare il contenuto di AB degli alimenti fermentati interferendo con la crescita e la riproduzione dei microrganismi. (Gao et al., 2023). La concentrazione di AB può aumentare durante l'invecchiamento e la conservazione del vino (Čuš et al., 2022). La tendenza a ridurre o a evitare l'uso dei solfiti in vinificazione, a vantaggio della salubrità finale del prodotto, rappresenta un elemento ulteriore di vulnerabilità.

Di recente è stato validato anche un metodo ufficiale per la determinazione del lisozima utilizzando i raggi UV-C. L'alternativa al lisozima, è l'uso della nisina, appartenente alla famiglia delle batteriocine, principalmente peptidi o proteine generati da batteri dotati di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici diversi dal ceppo produttore, che potrebbe rivelarsi una valida alternativa all'utilizzo degli antibiotici ([https⁷](https://)).

La nisina prodotta da ceppi di *Lactococcus lactis*, inibisce i batteri lattici senza interferire sulla crescita e sull'attività metabolica dei lieviti. Queste pratiche non sono attualmente contemplate tra quelle consentite in enologia, ma sono in fase di validazione da parte dell'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino (OIV 2011).

La crescita incontrollata di microrganismi indigeni, soprattutto appartenenti al gruppo dei batteri lattici con capacità decarbossilasica, è tra le principali cause dell'aumento di ammine nel vino, assieme all'elevata quantità di aminoacidi precursori.

Anche se le AB sono generalmente presenti nel vino in bassa concentrazione, è da evidenziare che gli effetti negativi sulla salute sono comunque potenziati per la simultanea presenza di questi composti in molti altri alimenti fermentati, come i formaggi e i salumi.

Diventa pertanto fondamentale ridurre i rischi di produzione di AB nell'industria enologica applicando adeguate procedure di sanificazione in cantina, in primis i contenitori in legno per limitare le contaminazioni microbiche e seguendo tutte le buone pratiche viticole ed enologiche, come anche espresso nel documento OIV a riguardo, per contrastare la proliferazione di batteri in grado di decarbossilare gli aminoacidi e così garantire la produzione di vini salubri e di qualità.

Tra le applicazioni più innovative a tal proposito, si sta diffondendo l'uso dell'ozono e dell'acqua elettrolizzata, tecniche altamente sostenibili e di facile impiego.

3.5 OIV

L'importanza della problematica ha portato l'OIV, a adottare nel 2011 un "Codice delle corrette pratiche vitivinicole atte a ridurre al massimo la presenza di ammine biogene nei vini", stabilendo misure da applicare nei vigneti e nelle cantine.

3.5.1 Interventi nel vigneto

Occorre rispettare la fertilizzazione, l'aerazione del fogliame e dei grappoli e la protezione fitosanitaria dell'uva, questi contribuiscono a limitare concentrazioni elevate di ammine biogene. Inoltre, qualsiasi pratica vitivinicola nociva alla qualità sanitaria dell'uva porta a valori elevati di azoto e valori di pH elevati che aumentano il rischio di formazione di ammine biogene.

La potatura è un'operazione delicata, determina un aumento di ammine, tra cui feniletilamina, istamina, putrescina e cadaverina. Generalmente, il diradamento delle uve e la limitazione di alcuni grappoli destinati alla vinificazione sono mirati a migliorare la qualità delle uve. I processi di diradamento devono essere realizzati tenendo conto dell'equilibrio vegetativo, in modo che i prodotti vitivinicoli possano migliorare ed esaltarne il contenuto fenolico. L'effetto della potatura è strettamente legato alle condizioni climatiche e il taglio deve essere valutato pianta per pianta. Un eccessivo assottigliamento potrebbe indurre uno squilibrio vegetativo-produttivo, che potrebbe influenzare la microflora naturale dell'uva, la composizione degli aminoacidi e infine, la qualità del vino per la sua composizione. Tuttavia, non è sempre facile fare la scelta ottimale poiché la potatura è fortemente condizionata dal terroir, dalla varietà, dal portainnesto, ecc. (La Torre et al., 2023).

3.5.2. Interventi durante la vendemmia

La vendemmia può essere manuale o meccanica e deve essere fatta in modo selettivo per scartare i grappoli o le parti di grappoli danneggiate dai funghi che potrebbero aumentare la formazione di ammine biogene nel vino.

3.5.3. Interventi in cantina

In cantina devono essere adottate appropriate pratiche igieniche. In caso di macerazione, la durata deve essere adatta allo stile dei vini che si desidera ottenere, nel caso in cui si utilizzano acini alterati la macerazione deve essere ridotta al minimo. La durata di macerazione varia in base all'arricchimento del mosto e/o del vino in aminoacidi precursori, all'aumentare del pH del vino e dall'attività dei lieviti e dei batteri autoctoni che possono incidere sulla produzione di AB.

Nel caso di pH del mosto ($\geq 3,6 - 3,7$), si raccomanda di abbassare il pH utilizzando i mezzi tecnici appropriati prima di procedere alla fermentazione alcolica e di evitare l'inizio della fermentazione malolattica spontanea per eliminare la proliferazione di batteri lattici prima della fermentazione alcolica. Si può aggiungere biossido di zolfo, tenendo presente che un pH elevato ne riduce l'efficacia; quindi, ne bisogna utilizzare in quantità maggiori oppure aggiungendo lisozima.

3.5.4 Operazioni di fermentazione

Se è necessario migliorare la capacità di fermentazione dei lieviti per assicurare la fermentazione alcolica, si può aggiungere azoto ammoniacale, lieviti inattivati o auto-lisato di lievito, i quali devono essere utilizzati a concentrazioni minime, in quanto sono precursori per la sintesi di ammine biogene. Inoltre, quando si effettua la fermentazione alcolica è meglio utilizzare ceppi di lieviti del tipo *Saccaromyces*, che hanno una bassa predisposizione alla formazione di ammine.

Al momento della fermentazione malolattica l'inoculo di batteri lattici deve avvenire dopo la scomparsa dell'effetto del lisozima e inoculare ceppi di batteri lattici selezionati che non presentino nessuna o al limite una bassa attività decarbossilasica (principalmente l'istidina-decarbossilasi e tirosina-decarbossilasi). Devono essere inoculati in quantità sufficienti, per assicurare un rapido inizio e una fine completa della fermentazione. Al termine della fermentazione malolattica si raccomanda di eliminare i microrganismi mediante l'aggiunta di biossido di zolfo.

3.5.5. Operazioni di elevage e di chiarifica

Inizialmente bisogna eseguire un'analisi microbiologica completa e determinare la popolazione di batteri lattici con attività decarbossilasica, per ridurre i rischi di produzione di AB. In seguito, si può eseguire la chiarifica, utilizzando la bentonite, un silicato di alluminio che ha un effetto

deproteinizzante che, una volta rigonfiata nel vino assume una carica negativa e si lega alle proteine facendole precipitare evitando che funga da substrato utilizzabile dai batteri lattici, (<https>⁸). Ha lo scopo di ridurre la popolazione batterica vitale e vitale-non-coltivabile, che utilizza gli aminoacidi dell'ambiente come fonte di energia una volta consumati i substrati naturali come gli zuccheri e l'acido malico (Castellucci, 2011).

3.6 Distinzione contenuto ammine in vini rossi e bianchi

Per quanto riguarda le diverse tipologie di vino, si può fare una distinzione tra i vini rossi che mostrano generalmente una maggiore concentrazione di ammine dovuta alla FML, rispetto ai vini bianchi e rosati che non vengono sottoposti a FML e presentano un pH inferiore che non consente un elevato sviluppo di ammine. Durante la produzione del vino, il processo di pressatura aumenta il contatto tra il vino e le parti solide come le fecce, le quali, ricche di proteine vengono idrolizzate in aminoacidi liberi (Garcia-Moruno et al., 2010). Molti tipi di ammine biogene sono state rilevate sia nel vino bianco che in quello rosso come tiramina, istamina, triptamina, monometilammina, 2-fenetilammina, putrescina, cadaverina, spermidina, ecc. (Lehtonen et al., 1996). Per quanto riguarda i vini biologici producono livelli più elevati di AB rispetto ai vini normali. Questo è legato alle condizioni in cui la FML si è verificata spontaneamente e ai bassi livelli di aggiunta di SO₂ per soddisfare le restrizioni legali (<https>⁹).

4. Ammine biogene nei formaggi

Il formaggio è un substrato ideale per la produzione di ammine biogene in quanto il suo processo produttivo comporta la disponibilità di aminoacidi liberi come risultato dei livelli di proteolisi, la presenza di microrganismi decarbossilasi e le condizioni ambientali ne consentono lo sviluppo (Loizzo et al., 2013). Il formaggio è tra i prodotti lattiero-caseari più importanti consumati in tutto il mondo, rappresenta un piatto primario che fornisce agli esseri umani, una quantità adeguata del loro fabbisogno di proteine, grassi ed elementi essenziali come calcio e magnesio. Allo stesso tempo, possono essere contaminati da sostanze tossiche naturali come le ammine biogene portando diversi effetti negativi alla salute. A causa dell'alto contenuto proteico, sono tra gli alimenti associati a maggiori quantità di AB che sono anche influenzate dalle materie prime, tipo di prodotto, ceppi di coltura iniziale e processo di produzione (Benkerroum, 2016; Schirone et al., 2022).

4.1. Il latte crudo, la materia prima per la produzione del formaggio

La composizione del latte crudo varia a seconda di molti fattori, come la specie, l'età, l'alimentazione, il periodo di allattamento, lo stato di salute degli animali, la mungitura, nonché le condizioni ambientali, l'igiene nell'azienda agricola e il mantenimento della temperatura appropriata durante il trasporto e lo stoccaggio che sono strategie efficaci per controllare lo sviluppo microbico. Il latte vaccino è costituito dai seguenti aminoacidi, lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina, acido glutammico, arginina, cisteina, asparagina e serina. L'attività proteolitica dei ceppi microbici che si verifica nel latte, può originare gli aminoacidi precursori della formazione di AB. Le principali fonti di contaminazione del latte derivano da suolo, feci, mangimi, dalle tettarelle che possono contenere diversi stafilococchi coagulasi-negativi, batteri e Enterobacteriaceae, infezioni della mammella, ambiente agricolo e/o personale che si occupa degli animali, nonché attrezzature per la mungitura e lavorazione. Durante il processo di produzione del formaggio, le scarse pratiche igieniche, il fallimento del trattamento termico e/o l'abuso di temperatura possono influire sia sulla qualità che sulla sicurezza del prodotto finale. La contaminazione microbica della materia prima rappresenta una grande preoccupazione per i casari, in quanto i microrganismi non solo alterano le caratteristiche sensoriali dei formaggi, ma possono produrre le AB (Schirone et al., 2022). Quando i batteri naturali del latte crudo vengono distrutti dalla pastorizzazione, l'aggiunta di colture di avviamento è fondamentale per garantire l'acidificazione. Il processo di base include la coagulazione acida delle micelle di caseina, la salatura, la rimozione del siero di latte mediante il taglio, l'agitazione e la produzione di acido lattico. I punti critici più importanti da considerare sono:

1. la consegna della materia prima, in quanto le popolazioni microbiche indigene presenti nel latte possono influenzare le fasi successive;
2. l'intensità o la durata del trattamento termico del latte;
3. la durata e le condizioni del processo di maturazione.

4.2 I batteri lattici produttori di ammine biogene nel formaggio

I principali produttori di AB nel formaggio sono i batteri Gram positivi, appartenenti ai diversi generi come *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus* che sono naturalmente presenti nel latte e/o introdotti durante il processo di produzione e possono anche essere parte di colture aggiuntive, ma solo alcuni ceppi sono produttori AB. Le specie più comuni sono *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* (tabella 4).

Biogenic amine	Producer microorganisms	Reference	
Histamine	Molds and yeast	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	Roig-Sagués et al. (2002), Gardini et al. (2006)
	Gram negative	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Morganella morganii</i>	Marino et al. (2000), Coton et al. (2011)
	Gram positive	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Martín et al. (2005), Burdychova and Komprda (2007), Calles-Enríquez et al. (2010)
Tyramine	Molds and yeast	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Gardini et al. (2006)
	Gram negative	–	
	Gram positive	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .	Fernández et al. (2007b), Lucas et al. (2007), Bonetta et al. (2008), Bunková et al. (2009), La Gioia et al. (2011), Ladero et al. (2012a)
Putrescine	Molds and yeast	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Wyder et al. (1999)
	Gram negative	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Proteus</i> .	ten Brink et al. (1990), Coton et al. (2011)
	Gram positive	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Llacer et al. (2007), Lucas et al. (2007), Ladero et al. (2011a,b)
Cadaverine	Molds and yeast	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Wyder et al. (1999)
	Gram negative	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Halomonas</i> sp., <i>Morganella</i> <i>morganii</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Meng and Bennett (1992), Marino et al. (2000), Coton et al. (2011)
	Gram positive	–	
Tryptamine	Molds and yeast	–	
	Gram negative	<i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i>	Marino et al. (2000), Coton et al. (2011)
	Gram positive	–	
Phenylethylamine	Molds and yeast	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Wyder et al. (1999)
	Gram negative	<i>Halomonas</i> , <i>Serratia</i>	Marino et al. (2000)
	Gram positive	<i>Enterococci</i>	Marcobal et al. (2006c)

In order to prevent misclassification, only those species which identification is based on the sequencing of 16S rRNA gene or other gene with taxonomical relevance have been included in the table.

Tabella 4. Batterii produttori di AB (Linares et al., 2012).

I batteri Gram-negativi principalmente *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas* spp. o *Serratia* spp.) sono stati descritti come contaminanti di

latte derivanti da cattive pratiche di fabbricazione o cattive condizioni ambientali e alcuni ceppi hanno dimostrato di essere in grado di produrre AB come istamina, putrescina e cadaverina (Schirone et al., 2022).

4.2.1 Formazione di ammine biogene

La formazione di AB può verificarsi durante la lavorazione e la conservazione degli alimenti a causa di batteri che hanno attività decarbossilasica. La produzione di prodotti lattiero-caseari non è un processo sterile e i produttori di AB rischiano di entrare nella catena alimentare come LAB non-starter che sono indigeni della materia prima. La formazione di AB è possibile solo se vi è disponibilità degli aminoacidi e le condizioni ambientali sono favorevoli all'attività di decarbossilazione (Linares et al., 2012). Le principali ammine biogene presenti nel formaggio sono generalmente tiramina, istamina, cadaverina, putrescina e triptamina in particolare la tiramina determina la reazione al formaggio (Tittarelli et al., 2019).

4.3 Fattori influenti sulla produzione di ammine biogene

I fattori che influenzano la produzione di AB nei formaggi includono, oltre alla presenza di microrganismi, diversi fattori estrinseci che svolgono un ruolo importante di seguito descritti (Loizzo et al., 2013).

4.3.1 Le culture ed enzimi di avviamento

Le colture di avviamento vengono utilizzate per garantire la qualità standard dei prodotti finali. Alcuni LAB utilizzati come colture di avviamento, possono avere specifiche attività decarbossilasiche, quindi, di sintetizzare AB che potrebbero essere accumulate nei formaggi. Appartenenti a questo gruppo sono lattococchi, lattobacilli e streptococchi. Il rischio di incorporare ceppi produttrici di AB può essere ridotto al minimo utilizzando colture di avviamento ben caratterizzate. Un altro approccio per ridurre l'accumulo di AB nei prodotti lattiero-caseari potrebbe essere l'uso di colture aggiuntive che includono batteri in grado di degradare le AB (Linares et al., 2012).

4.3.2 La pastorizzazione

La pastorizzazione è un trattamento termico che riduce il carico microbico del latte crudo. È stato a lungo utilizzato dall'industria lattiero-casearia per estendere la durata di conservazione (*shelf-life*) dei prodotti lattiero-caseari riducendo la presenza di batteri del deterioramento, agenti patogeni e quei microrganismi con la capacità di produrre ammine che renderebbero i prodotti non sicuri per il

consumo. Inoltre, alcuni *Lactobacillus* ed *Enterococcus* produttori di AB sono resistenti alla pastorizzazione e potrebbero svilupparsi come microbiota secondario dopo il trattamento termico, con conseguente apparizione di AB nel prodotto finale. Di conseguenza, la pastorizzazione stessa non è la soluzione definitiva al problema delle AB. La tecnologia ad ostacoli (*hurdle technology*) combina la pastorizzazione con altri trattamenti, come l'alta pressione (*HHP High Hydrostatic Pressure*) e potrebbero ridurre la presenza di AB nei formaggi, anche se non sono ancora stati ottenuti risultati. Infine, è importante sottolineare che l'uso di latte di buona qualità microbiologica, se viene inoculato con starter produttori di AB, il problema persiste (Ladero et al., 2011; Linares et al., 2012).

4.3.3 Condizioni igieniche

Anche le condizioni igieniche carenti possono favorire la contaminazione con i microrganismi produttori AB durante la fabbricazione del formaggio dopo che il trattamento termico è stato compiuto (Loizzo et al., 2013).

4.3.4 Utilizzo dell'alta pressione (HHP)

L'applicazione della pressione nella gamma di 100-1000 MPa è uno dei metodi più promettenti di trattamento degli alimenti e conservazione degli alimenti a temperatura ambiente in quanto l'applicazione di questa tecnologia non termica ha i vantaggi di mantenere le proprietà sensoriali e nutrizionali degli alimenti. Tuttavia, Novella-Rodríguez et al., hanno riportato che l'applicazione di 50 MPa per 72 h ha prodotto maggiori concentrazioni di ammine e una concentrazione di tiramina tre volte superiore rispetto ai formaggi non trattati. Al contrario, il contenuto di ammina del campione trattato con una pressione più elevata per un breve periodo di tempo (400 MPa per 5 min) era simile al lotto di controllo.

4.3.5 Processo di maturazione e proteolisi

Un altro fattore che influenza fortemente l'accumulo di AB nel formaggio è il periodo di maturazione. La maturazione del formaggio è un fenomeno complesso che produce una serie di eventi fisico-chimici, biochimici e biologici strettamente collegati tra loro. Il substrato è rappresentato dalla caseina, ma il processo coinvolge anche i lipidi. Gli amminoacidi liberi possono essere ulteriormente decarbossilati dagli enzimi batterici, producendo l'accumulo di AB. Pertanto, i tempi di maturazione prolungati sono considerati una delle principali cause dell'aumento dei AB nel formaggio. Ne consegue che il contenuto di AB nei formaggi stagionati è in generale molto più alto di quelli dei formaggi non maturati da 10 a 2000 volte superiori. Nei formaggi stagionati vengono generalmente

rilevati tiramina, putrescina, cadaverina, istamina e a concentrazioni più basse feniletilamina, triptamina e spermidina (Loizzo et al., 2013).

4.3.6 Il pH

Il pH è un parametro fisico-chimico, le fermentazioni lattiero-casearie sono associate ad un ambiente a basso pH causato dalla fermentazione del lattosio all'acido lattico. Certamente, è noto che il pH basso è un fattore cruciale per l'attività decarbossilasica. Linares et al., hanno rivelato che l'aumento della produzione di tiramina da parte di *Enterococcus durans* in condizioni di basso pH è determinato da un'induzione significativa dell'espressione di decarbossilasi (*tdcA*) e dei geni trasportatori (*tyrP*), mentre non sono espressi a pH neutro. Allo stesso modo, i geni *tdc* e *aguA1* di *L. brevis* sono indotti dal basso pH. Il pH basso è un parametro chiave che rappresenta un potenziale rischio di accumulo di AB nel prodotto finale. Tuttavia, è difficile agire su questo parametro, poiché è inerente al processo di fermentazione. Gli enzimi mostrano un'attività ottimale a pH acido, in particolare tra 4 e 5,5 può favorire la produzione di ammine. Inoltre, i campioni con basso contenuto di acidi organici totali hanno generalmente mostrato concentrazioni più basse di AB totali, mentre i campioni con alto contenuto di acidi organici totali avevano anche concentrazioni più elevate di tutte le AB. (Loizzo et al., 2013).

4.3.7 La temperatura

La temperatura è un parametro chiave nell'elaborazione dei formaggi, partendo dall'latte dove, dopo la raccolta le temperature di conservazione devono essere comprese tra 6 e 8 gradi e la sua conservazione a non più di 6 gradi sono essenziali sia per la qualità che per la sicurezza del prodotto finale, in quanto tali condizioni favoriscono lo sviluppo di un utile microbiota lattico e ostacolano la crescita di batteri patogeni o di deterioramento. Inoltre, influenza l'accumulo di AB in particolare durante le fasi di maturazione e conservazione dei formaggi. Lo stoccaggio del prodotto include il periodo compreso tra l'ultima fase della produzione, la maturazione fino al consumo. Le basse temperature di maturazione e conservazione (ad esempio, 5°C) diminuiscono l'accumulo di AB (Gardini et al., 2001; Martuscelli et al., 2005). Anche se il formaggio è conservato in refrigerazione, l'accumulo di AB potrebbe superare i limiti di sicurezza per il consumo. Mentre se la temperatura è di congelamento (ad esempio -18°C) compromette l'aumento dell'accumulo delle AB, perché l'attività microbica viene interrotta (Linares et al., 2012). Alcuni ceppi appartenenti a *Pseudomonas* spp. sono considerati importanti microrganismi di deterioramento del formaggio e sono anche in grado di produrre AB. Al contrario, Calles-Henrquez et al. hanno riferito che i ceppi di *St. thermophilus* hanno

prodotto basse quantità di istamina se conservati a temperatura di refrigerazione (4°C) dopo la sua crescita nel latte (Schirone et al., 2022).

La crescita microbica, le reazioni biochimiche e la produzione di metaboliti aumentano generalmente dall'aumento della temperatura di conservazione, portando ad un accumulo di AB. A causa dell'aumento della temperatura di maturazione l'attività proteolitica della microflora del formaggio ha raddoppiato la produzione di AB. L'aumento della temperatura potrebbe ridurre il tempo di maturazione a circa la metà rispetto al periodo di maturazione alla temperatura standard, tuttavia, ha causato una maggiore produzione di AB a concentrazioni abbastanza pericolose (Loizzo et al., 2013).

4.3.8 Il cloruro di sodio

Tradizionalmente il cloruro di sodio è stato impiegato per controllare la crescita di agenti patogeni e deterioranti durante il processo di fermentazione e maturazione dei prodotti lattiero-caseari. La maggior parte dei formaggi a base di latte crudo raggiungono un elevato numero di *Enterococcus spp.* L'alta concentrazione di cloruro di sodio (circa 5%) al latte inoculato con *Enterococcus faecalis*, riduce al minimo la quantità di produzione di 2-feniletilamina e tiramina. La diminuzione della produzione di AB potrebbe essere spiegata dall'effetto inibitorio dell'alto contenuto di sale sul tasso di crescita dei batteri produttori di AB (Gardini et al., 2001) e/o sulle attività di decarbossilazione dell'aminoacido. Gli effetti del sale durante la preparazione del formaggio includono il controllo della crescita e delle varie attività enzimatiche, la riduzione del contenuto di umidità, i cambiamenti fisici delle proteine del formaggio che possono influenzare la consistenza del formaggio, lo sviluppo del sapore e la formazione di AB da amminoacidi liberi. Un diverso contenuto di sale potrebbe essere correlato con la variazione della composizione della microflora, che porta in un secondo tempo a diverse formazioni di AB. In particolare, le basse concentrazioni di NaCl aumentano la concentrazione di AB. D'altra parte, sembra esistere un equilibrio dinamico tra formaggio e salamoia e molti composti a basso peso molecolare come le AB e aminoacidi liberi, i quali possono migrare dal formaggio verso la salamoia (Linares et al., 2012; Sumner et al., 1990).

4.4 Processi post-produzione

Negli ultimi anni sono apparsi sul mercato molti formaggi sottoposti a tecnologie, tagliati, affettati e grattugiati, il contatto del formaggio con le superfici dell'apparecchiatura durante la lavorazione implica un aumento del rischio correlato alla contaminazione microbica. Sono state considerate anche le fette di formaggio e si è notato che il contenuto di AB dipende dalla posizione, il bordo ha mostrato

una maggiore concentrazione di AB rispetto ai livelli trovati al centro della fetta (Loizzo et al., 2013). Anche l'imballaggio incide sulla produzione di ammine biogene nel formaggio durante lo stoccaggio. È stato riscontrato che il metodo dell'imballaggio ha avuto un effetto significativo sulle concentrazioni di cadaverina, istamina, tiramina e fenilettilamina nei campioni conservati a 4°C. I formaggi confezionati senza vuoto avevano quantità maggiori di putrescina, cadaverina, istamina e tiramina rispetto ai formaggi sottovuoto, allo stesso tempo questi avevano quantità di acido lattico, formico, acetico e butirrico elevate rispetto ai formaggi non confezionati con il vuoto.

4.5. Strategie di prevenzione e controllo delle ammine

Il contenuto di AB nel formaggio dipende principalmente dalla presenza di specie microbiche che producono decarbossilasi. Pertanto, la selezione delle colture di decarbossilasi negativa che mostra l'attività degradante delle AB può ostacolare il loro accumulo nel formaggio (Benkerroum 2016). L'aggiunta di colture di avviamento generalmente utilizzate nell'industria lattiero-casearia per scopi tecnologici è consigliata anche per la loro attività probiotica e la capacità di beneficiare il sistema immunitario umano. Tuttavia, non è facile selezionare un LAB starter universale come ostacolo di AB da utilizzare negli alimenti fermentati, in quanto differiscono nel tipo di materia prima, nella popolazione microbica iniziale e nei tipi di aminoacidi liberi. È stata studiata anche l'applicazione di oli essenziali contro AB come l'olio essenziale di *Zataria multiflora* che ha riportato una riduzione della tiramina e dell'istamina nel formaggio Gouda (Schirone et al., 2022).

4.6 Il tenore di ammina biogene in diversi formaggi

I prodotti lattiero-caseari fermentati mostrano una grande variabilità dei livelli di AB, a seconda del diverso grado di contaminazione delle materie prime, fasi e tempo di conservazione, maturazione e dell'uso di colture di avviamento. Durante la fermentazione, la conversione del lattosio in glucosio e galattosio e successivamente in acido lattico porta all'acidificazione del latte che inibisce la crescita dei microrganismi. Le concentrazioni di AB sono mostrate nella Tabella 5.

Le concentrazioni di AB possono aumentare durante lo stoccaggio e per tutta la durata di conservazione del prodotto. Nei formaggi a pasta molle, le concentrazioni di cadaverina, tiramina e istamina hanno mostrato un aumento durante la conservazione. Al contrario, nei formaggi a pasta dura, le concentrazioni di istamina e tiramina sono rimaste abbastanza stabili. L'elevata attività microbica nei prodotti a lungo stagionati come i formaggi a pasta dura potrebbe portare a un notevole accumulo di AB al giorno di acquisto rispetto ai formaggi semiduri con un tempo di fermentazione

più breve, in cui tale attività si è evoluta principalmente durante la *shelf-life*. I formaggi erborinati hanno livelli più alti di AB rispetto ai formaggi non erborinati, un fenomeno legato all'aumento dell'attività proteolitica delle muffe (Schirone et al., 2022).

Tra le AB, la tiramina è la più presente, seguita dall'istamina.

Source	Type		Cad	His	Phe	Put	Tyr	Spn	Spd	Reference
Milk	Raw	Cow	nd	nd	nd	nd	nd	0.18	nd	Novella-Rodríguez et al. (2000)
		Ewe	–	0.3	–	–	–	–	–	Bodmer et al. (1999)
	Pasteurized	Cow	–	0.7	–	–	–	–	–	Pinho et al. (2004) Bodmer et al. (1999)
Yogurt			–	13	–	–	–	–	–	Bodmer et al. (1999)
			0.27	nd	nd	nd	nd	0.43	0.34	Novella-Rodríguez et al. (2000)
Cheese (raw milk)		Sheep	123.07	50	–	107.69	125	115.38	369.23	Mercogliano et al. (2010)
		Sheep	26.8	0	28.6	394.1	499.6	96.4		Schirone et al. (2011)
		Goat	349.72	15.6	9.39	217.84	216.28	nd	nd	Pinho et al. (2004)
		Goat	88.7	88.4	11.7	191.8	830.5	–	–	Novella-Rodríguez et al. (2002)
		Goat	94	117	160	941	258	70.5	23.5	Galgano et al. (2001)
		Cow	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Fernández et al. (2007b)
	Parmigiano Extra hard grana	Cow	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Fernández et al. (2007b)
		Cow	3.2	10.9	–	1.8	6.4	4.4	–	Mayer et al. (2010)
		Cow	15.56	28.55	9.51	75.87	29.89	7.71	4.46	Innocente and D'Agostin (2002)
		Cow		249	–		18	–	–	Mayer et al. (2010)
Cheese (pasteurized milk)	Feta	Goat	82.8	84.6	4.94	193	246	nd	nd	Valsamaki et al. (2000)
	Emmental Hard	Cow	98.3	23.5	–	38	52.2	–	16.8	Mayer et al. (2010)
	Cheddar	Cow	nd	25.4	–	4.8	–	8.5	18.2	Mayer et al. (2010)
	Semi hard	Cow	nd	–	–	–	24.3	5.0	17.3	Mayer et al. (2010)
	Gouda	Cow	nd	–	–	–	2.43	0.5	1.73	Mayer et al. (2010)
	Edam	Cow	nd	3.2	–	–	–	–	–	Mayer et al. (2010)
	Gorgonzola	Cow	nd	23.7	–	–	–	–	–	Mayer et al. (2010)
	Gorgonzola	Cow	33.7	255.3	–	3.2	13.2	10.8	17.2	Mayer et al. (2010)
	Smear	Cow	748.2	168.3	–	31.3	2476	18.5	16.6	Mayer et al. (2010)
	Semiripenned	Cow	33.49	24.38	25.75	22.6	32.92	24.35	23.4	Latorre-Moratalla et al. (2009)
		Cow	nd	65.42	–	175.39	80.9	–	–	Fernández et al. (2007b)
		Goat	nd	27.68	–	18.12	30.48	–	–	Fernández et al. (2007b)
		Sheep	nd	nd	–	nd	301.6	–	–	Fernández et al. (2007b)
Pecorino Abruzzese	Sheep	80	90	300	200	280	nd	20	Martuscelli et al. (2005)	
Cheese (blue)	Roquefort		8.9	9.9	7.7	18.3		4.6	18.1	Mayer et al. (2010)
			nd	50	nd	25	2000	nd	18	Rabie et al. (2011)
			2101.4	376.6	39.7	2572	1585.4	–	–	Novella-Rodríguez et al. (2003)
	Mixture	756.78	1041.81	875.8	1051.98	–	–	–	Fernández et al. (2007b)	
		489.4	127.2	–	237.56	526.63	–	–	Fernández et al. (2007b)	
Kefir			1.8	4.0	nd	12.1	12.8	nd	4.5	Özdestan and Üren (2010)
			2.2	1.6	nd	1.4	9.8	nd	1.5	Özdestan and Üren (2010)

Cad, cadaverine; His, histamine; Phe, 2-phenylethylamine; Put, putrescine; Tyr, tyramine; Spn, spermine; Spd, spermidine; nd, undetected; –, not determined.

Tabella 5. Valori di ammine biogene in prodotti lattiero-caseari (Linares et al., 2012)

I formaggi tradizionali sono spesso preferiti dai consumatori per le loro caratteristiche qualitative che derivano dal processo di produzione del formaggio, come l'uso di latte crudo rispetto al latte

pastorizzato. Infatti, molti casari preferiscono utilizzare il latte crudo per un sapore migliore e più forte del prodotto finale rispetto al latte pastorizzato, ma dovrebbero sempre considerare il rischio di formazione di sostanze indesiderabili come le AB.

5. Analisi per il rilevamento delle ammine nei prodotti fermentati

La rilevazione delle AB è importante nell'ambito dell'indagine dei casi di potenziale intossicazione alimentare, per la verifica dei processi di produzione alimentare, incluso l'HACCP e come misura della qualità e freschezza sia delle materie prime che dei prodotti finiti. I metodi comunemente utilizzati nella quantificazione delle AB possono essere suddivisi in due gruppi: quelli basati sulla rilevazione delle ammine stesse e quelli basati sul rilevamento dei microrganismi di produzione. I metodi utilizzati per la determinazione delle ammine comportano l'estrazione, la purificazione e la determinazione analitica. Non c'è ancora consenso su quale solvente sia più appropriato per l'estrazione di ammine in quanto nessuno dei solventi estrae in modo efficiente tutte le ammine. L'acido cloridrico (HCl) sarebbe il miglior estrattore di ammine, nel formaggio grattugiato ad esempio estrae sette delle dieci ammine. Tuttavia, quando si desidera l'estrazione selettiva di alcune ammine, devono essere utilizzati solventi diversi per ottimizzare il recupero dell'ammina di interesse. I tradizionali metodi di rilevamento delle AB, sono la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), la colorimetria, la cromatografia su strato sottile (TLC) ed l'elettroforesi capillare (CE) e stanno emergendo nuovi metodi di rilevamento come la Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction (SALLE). La maggioranza dei saggi utilizza il rilevamento fluorimetrico e UV con tecniche di derivazione pre o post colonna con diversi agenti derivati.

5.1 HPLC

L'HPLC è il metodo più frequentemente utilizzato e accurato per il rilevamento delle AB. Si basa sulle differenze nelle dimensioni delle AB e sull'interazione tra AB e la fase stazionaria. Presenta i vantaggi di una quantificazione accurata, velocità e sensibilità elevata, mentre presenta gli svantaggi di un prezzo elevato dell'attrezzatura, di aumento del rischio di perdita di analita e di un pretrattamento del campione complicato e dispendioso in termini di tempo, tra 20 e 60 minuti per campione. Nel caso del formaggio la determinazione delle ammine viene fatto con l'utilizzo di UHPLC, cromatografia liquida ad altissima prestazione, che consente una drastica riduzione del tempo di analisi, aumentando la risoluzione e la sensibilità con derivazione post-colonna di o-ftalaldeide. Il metodo ha permesso di determinare 12 AB in un campione di formaggio in meno di 7 minuti quindi una diminuzione del tempo di esecuzione tra 5 e 11 volte rispetto ai metodi HPLC convenzionali. Ciò consente l'analisi di un gran numero di campioni non solo in un tempo minore, ma anche utilizzando minore quantità di solventi, in accordo con i criteri di sostenibilità ambientale.

5.2 Colorimetria

La colorimetria è un metodo spettroscopico conveniente per il rilevamento delle AB, si basa su tecniche relativamente semplici come reazioni acido-base. Può essere combinata con altre tecniche per sviluppare metodi di rilevamento delle ammine a basso costo e facili da usare. Il rilevamento non richiede attrezzature e reagenti costosi. Tuttavia, è limitata al rilevamento delle singole ammine con struttura specifica.

5.3 Cromatografia su strato sottile

La TLC è stata una delle prime tecniche utilizzate per determinare le ammine biogene negli alimenti, è un metodo conveniente per separare e semi-quantificare diverse AB nello stesso campione. Il principio è quello di assorbire le AB dallo strato di cellulosa o gel di silice sulla lastra di vetro in base alle differenze di affinità tra le diverse AB e i mezzi di adsorbimento. La TLC presenta i vantaggi di attrezzature semplici e a basso costo, ma la riproducibilità e la sensibilità analitica sono relativamente scarse.

5.4 Elettroforesi Capillare

La CE è un metodo di analisi che utilizza la corrente continua ad alta tensione come forza motrice e un capillare di quarzo come canale di separazione per ottenere la separazione in base alle differenze nella mobilità e nel comportamento di distribuzione dei diversi componenti nel campione. La derivatizzazione non viene eseguita e il miglioramento dell'efficienza di separazione fanno sì che i metodi CE abbiano un grande potenziale applicativo nella rilevazione di AB nelle bevande alcoliche, con una buona sensibilità e riproducibilità, ma ha una bassa efficienza di separazione in altri alimenti fermentati e non può fornire riproducibilità e sensibilità sufficienti rispetto ai metodi cromatografici.

5.5 Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction

È noto che l'aggiunta di un sale inorganico ad una miscela di acqua e di un solvente organico miscibile con acqua provoca la separazione del solvente dalla miscela e la formazione di un sistema a due fasi. A volte questo fenomeno viene definito separazione di fase indotta dal sale "salting-out" e avviene per un certo numero di sostanze organiche miscibili con acqua. Sali diversi e diverse concentrazioni saline causeranno diversi gradi di separazione di fase. I solventi ad alta polarità e miscibili con acqua utilizzati nei sistemi di salting-out sono stati studiati per l'estrazione o la concentrazione di molti

analiti che non possono essere estratti con i metodi di estrazione liquido-liquido convenzionali. La SALLE è una nuova metodologia per la determinazione delle ammine biogene nel formaggio, basata sull'estrazione liquido-liquido assistita. Il metodo presenta una pre-estrazione delle ammine biogene solubili con acido cloridrico, una derivazione con cloruro di 5-dimetilamminonafthalen-1-solfonile (o cloruro di dansile). La SALLE è una buona alternativa ai metodi esistenti poiché semplifica la fase di preparazione del campione, migliorando al contempo la selettività complessiva del processo. La SALLE può essere applicata a una gamma più ampia di analiti da bassa ad alta polarità, utilizza quantità inferiori e solventi più rispettosi dell'ambiente, è più semplice e veloce e la procedura per l'estrazione delle ammine da campioni di formaggio viene eseguita in meno di 25 minuti. La SALLE offre molti vantaggi rispetto alle tecniche di estrazione convenzionali fornendo un estratto che può essere immediatamente iniettato in un sistema cromatografico liquido, senza ulteriore purificazione o filtrazione. Il metodo sviluppato consente la quantificazione, nella stessa esecuzione, di 10 AB nel formaggio utilizzando cromatografia liquida ad alte prestazioni combinata con rilevazione di fluorescenza. Il metodo SALLE si è rivelato un'ottima alternativa per la determinazione delle AB in campioni solidi (Ramos et al., 2020).

HPLC e CE sono le tecniche cromatografiche più comuni per l'analisi delle AB negli alimenti (Zhang et al., 2019).

Oltre alle metodologie analitiche, sono stati sviluppati diversi metodi per rilevare la produzione di AB attraverso microrganismi (Linares et al., 2011). Per quanto riguarda il rilevamento dei microrganismi di produzione, i metodi di screening sono stati inizialmente basati sull'uso di mezzi differenziali contenenti un indicatore di pH per identificare i ceppi produttori di AB. Tuttavia, questi metodi sono laboriosi e dispendiosi in termini di tempo.

La caratterizzazione dei geni che codificano gli enzimi decarbossilanti ha portato allo sviluppo di nuovi metodi basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR). Un ceppo che trasporta i geni dell'amino decarbossilasi è un potenziale produttore di AB e la sua presenza dovrebbe essere evitata nel cibo. Questi geni sono buoni candidati per la progettazione di primer specifici per rilevare i ceppi produttori di AB da PCR.

La PCR è stata utilizzata con successo con campioni di formaggio. Un importante vantaggio di questa tecnica è il rilevamento dei microrganismi produttori di ammine prima che le stesse siano rilevate nel campione evitando l'accumulo nel prodotto finale (Loizzo et al., 2013; Gao et al., 2023).

6. Considerazioni finali

Se dopo in un pasto, per esempio un aperitivo o una cena ricca di formaggi, salumi e vino, alcune persone lamentano dopo qualche ora dolori alla testa, nausea e dolori addominali, questi sono dovuti alle ammine biogene.

In genere le ammine biogene, non sono negative per il nostro organismo, anzi svolgono importanti funzioni vitali, ad esempio, fungono da neurotrasmettitori, sintesi di acidi nucleici e regolano il sistema nervoso centrale, con un'azione ipotensiva o ipertensiva. Al tempo stesso possono determinare disturbi, ma non tutte le persone rispondono nello stesso modo. I sintomi dipendono dalla quantità assunta, dallo stato di salute e dalle loro capacità di tollerare queste sostanze.

Non ci sono alimenti fermentati esclusi, ma formaggi e vini, artigianali, biologici e industriali presentano un'elevata quantità di aminoacidi liberi che durante il processo di fermentazione vengono decarbossilati in ammine biogene da batteri lattici. I batteri lattici sono i microrganismi associati alla decarbossilazione degli aminoacidi e alla formazione di ammine biogene. Tuttavia, in base all'alimento ce ne sono di più predisposti come *O. oeni* nel caso del vino ed *Enterococcus* nei formaggi. Le principali ammine biogene che si trovano in questi alimenti sono tiramina, istamina, putrescina, cadaverina e feniletilamina.

Attualmente non esiste una legislazione che definisca i limiti della tolleranza delle AB nei prodotti alimentari fermentati, esiste solo per il contenuto di istamina nel pesce. I livelli tossici sono diversi per ciascuna AB e i limiti sono diversi da persona a persona. L'obiettivo è quello di individuare strategie che ne limitino il contenuto. In questo elaborato sono state indicate le misure di prevenzione e quelle che favoriscono lo sviluppo.

Nel vino le concentrazioni di ammine biogene dipendono da molti fattori, partendo dalla materia prima, quindi dagli acini, dal tipo di terreno, dalle tecniche di vinificazione e dalla tipologia di vino che si produce. Le concentrazioni degli aminoacidi precursori vengono influenzate dalla macerazione delle bucce e in genere i vini rossi presentano una concentrazione di ammine più elevata di quelli bianchi. La formazione delle ammine è determinata anche dal pH, dall'etanolo che è un MAO e potrebbe aumentare il rischio di intossicazione delle AB e dalla anidride solforosa.

Anche per quanto riguarda i formaggi, il latte incide sulla presenza di ammine nel prodotto finito. Fattori come il pH, le condizioni igieniche, il processo di maturazione, la temperatura influenzano le

attività metaboliche dei microrganismi che poi producono ammine nei formaggi. Il formaggio è il cibo che raggiunge le più alte concentrazioni di AB. Pertanto, dovrebbe essere esercitato un controllo più severo essendo un prodotto molto consumato. Inoltre, le AB sono distribuite in modo non uniforme all'interno del formaggio, nel quale possono raggiungere concentrazioni che rappresentano un rischio per la salute. Infine, il miglioramento delle condizioni igieniche, l'utilizzo di basse temperature di conservazione, contribuiscono a limitare l'accumulo di AB e a produrre formaggi più sani. Tuttavia, molti parametri chimico-fisici non possono essere facilmente modificati in quanto sono strettamente correlati al processo di fermentazione.

Per prevenire lo sviluppo, bisogna inoculare starter microbici che inibiscono l'attività dei LAB indigeni e i microrganismi con attività decarbossilasica capaci di produrre AB. Il miglioramento delle pratiche agricole ed enologiche potrebbe controllare in una certa misura il contenuto delle AB, garantendo in tal modo la qualità, la sicurezza del prodotto sul mercato.

Per entrambi i prodotti, più lungo è il periodo di maturazione più è elevata la concentrazione.

Ci sono diverse tecniche di analisi qualitative e quantitative; che hanno vantaggi e svantaggi. La più utilizzata è l'HPLC, ma vi è anche la colorimetria, elettroforesi capillare e si stanno evolvendo nuovi metodi come il SALLE. Alcune richiedono attrezzature specifiche, altre sono più semplici e veloci. La scelta delle tecniche analitiche dipende dallo scopo di analisi, tipo di AB, proprietà del campione, e la maggior parte dei metodi pubblicati sono adatti al meglio per l'analisi qualitativa. Le AB non hanno gruppi di assorbimento fluorescenti o ultravioletti, quindi, spesso devono essere derivati prima del rilevamento.

La produzione di AB in prodotti fermentati è un fenomeno complesso, dipendente da diversi parametri, le cui interazioni e combinazioni sono numerose. Il monitoraggio delle materie prime e dei prodotti in più punti lungo la catena alimentare potrebbe essere utile per comprendere la rilevanza di questi fattori durante la produzione, la distribuzione e lo stoccaggio. Le attuali opzioni di controllo per ridurre al minimo l'insorgenza di AB negli alimenti sono principalmente focalizzate sul livello di lavorazione degli alimenti, compresa la manipolazione delle materie prime, il processo di fermentazione e lo stoccaggio, in quanto costituiscono i fattori più importanti per l'accumulo delle AB. La sicurezza è un requisito fondamentale che deve essere sempre soddisfatto nella produzione alimentare.

Non esiste uno standard unificato e completo per il limite le AB negli alimenti in vari paesi, tuttavia i paesi più sviluppati hanno stabilito standard relativamente efficaci per le AB negli alimenti.

Bibliografia

Barbieri F., Montanari C., Gardini F., Tabanelli G., (2019). Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria. *Foods*, 8, 17.

Benkerroum N., (2016). Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 15, 801-826.

Castellucci F., (2011). Codice OIV delle buone pratiche vitivinicole atte a limitare al massimo la presenza di ammine biogene nei prodotti derivati dalla vite.

Čuš F., Baša Česnik H., Velikonja Bolta S., (2022). Pesticide residues, copper and biogenic amines in conventional and organic wine. *Food Control*, 108534.

Del Rio B., Fernandez M., Redruello B., Ladero V., Alvarez M., (2023). New insights into the toxicological effects of dietary biogenic amines. *Food Chem.*, 435, 137558.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), (2011). Scientific opinion on risk- based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.*, 9, 2393.

Gafner J., (2003). Biological stability of wine and biogenic amines. *Annual New York Wine Industry Workshop*, 32, 74-80.

Gao X., Li C., Ronghai H., Yaqiong Z., Wang, Zhi-Hong Z., Chi-Tang H., (2023). Research advances on biogenic amines in traditional fermented foods: Emphasis on formation mechanism, detection and control methods. *Food Chem.*, 405, 134911.

Garcia-Moruno E. e Muñoz R., (2017). *Oenococcus Oeni* produce istamina? *Sperimentazione documento tecnico*, 9, 87-91.

Gardini, F., Martuscelli, M. Caruso, M.C., Galgano, F., Crudele, M A., Faviti, F., Suzzi G., (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J.Food Microbiol.*, 64, 105-107.

Guo Y., Yang Y., Peng Q., Han Y., (2015). Biogenic amines in wine: a review. *Chem., Int. Food Sci. Technol.*, 50, 1523–1532.

- La Torre G.L., Rotondo A., Salvo A., (2023). Do vine cropping and breeding practices affect the biogenic amines' content of produced wines. *J. Food Compos. Anal.*, *115*, 104901.
- Ladero V., Calles-Enriquez M., Fernandez M., Alvarez M.A., (2010). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Curr. Nutr. Food Sci.*, *6*, 145-156.
- Ladero V., Sánchez-Llana E., Fernández M., Alvarez M.A., (2011). Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *Int. J. Food Sci. Technol.*, *46*, 3516-3521.
- Lehtonen P., (1996). Determination of Amines and Amino Acids in Wine, a Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, *47*, 127-133.
- Linares D.M., Del Río B., Ladero V., Martínez N., Fernández M., Cruz M., Álvarez M., (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Front. Microbiol.*, *3*, 180.
- Linares D.M., Martin M., Ladero V., Alvarez M. A., e Fernndez M., (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical reviews Food Sci. Nutr.*, *51*, 691-703.
- Loizzo M.S., Menichini F., Picci N., Puoci F., Spizzirri U.G., Restuccia D., (2013). Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Tren. Food Sci. Technol.*, *30*.
- Lonvaud-Funel A., (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteri. *FEMS Microbiol. Lett.*, *199*, 9–13.
- Martuscelli M., Gardini F., Torriani S., Mastrocola D., Serio A., Chaves-Lopez C. e Suzzi G., (2005). Prouction of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *Int. Dairy J.*, *15*, 571-578.
- Müller D.G., Oreste E., Heinemann M.G., Dias D., Kessler F., (2022). Biogenic amine sensors and its building materials: A review. *Eur. Polym. J.*, *175*, 111221.
- Ordóñez J.L., Callejón R.M, Troncoso A.M., García–Parrilla M.C., (2017). Evaluation of biogenic amines profile in opened wine bottles: Effect of storage conditions. *J. Food Compos. Anal.*, *63*, 139-147.
- Palomino-Vasco M., Rodríguez-Cáceres M., Mora-Diez N., Pardo-Botello R., Acedo-Valenzuela M.I., (2019). Biogenic amines profile in red wines regarding aging and storage conditions. *J. Food Compos. Anal.*, *83*, 103295.

- Ramos R.M., Brandão P.F., António Rodrigues J., (2020). Development of a SALLE-HPLC-FLD Analytical Method for the Simultaneous Determination of Ten Biogenic Amines in Cheese. *Food Anal. Methods*, 13, 1088–1098.
- Schirone M., Visciano P., Conte F., Paparella A., (2022). Formation of biogenic amines in the cheese production chain: Favouring and hindering factors. *Int. Dairy J.*, 133, 105420.
- Silla Santos M.H., (1996), Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 29, 213-231.
- Sumner S., Roche F., Steve L. T., (1990). Factors Controlling Histamine Production in Swiss Cheese Inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.*, 73, 3050-3058.
- Tiris G., Yanıkoğlu R.S., Ceylan B., Egeli D., Kepekci Tekkeli E., Önal A., (2023). A review of the currently developed analytical methods for the determination of biogenic amines in food products. *Food Chem.*, 398, 1333919.
- Tittarelli F., Perpetuini G., Di Gianvito P., Tofalo R., (2019) Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT*, 101, 1-9.
- Torriani S., (2015). Ammine biogene nel vino: minimizzare i rischi. *Mille Vigne* 40-41.
- Wöhrl, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K., e Jarisch, R., (2004). Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy Asthma Proc.*, 25, 15603203.
- Yates H.S.A., Carter J.F, Hungerford N.L, Fletcher M.T, (2023). Ion chromatography and ion chromatography / mass spectrometry as a complementary analysis technique for amino acid analysis in food, a review. *Food Chem. Adv.*, 3, 100415.
- Zhang Y., Zhou Y., Li G., Yang W.Z., Feng X.S., (2019). A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010. *J. Chromatogr. A.*, 1605, 360361.

Sitografia

https1: Biomolecole Amino Acids,

https://www.toppr.com/guides/chemistry/biomolecole/aminoacids/#Classification_of_Amino_Acids

https2: Tutto quello che devi sapere sull'istamina, <https://www.psoriasimetodoapollo.com/istamina-quello-che-devi-sapere-parte-2/>

https3: L'Approfondimento: le Ammine Biogene nel vino, <https://www.oeno.it/lapprofondimento-ammine-biogene/>

https4: ammine biogene nel vino: minimizzare i rischi, <https://www.viten.net/files/78e/78e067178c214dde45f54ce33dbfc4e7.pdf>.

https5: “La fermentazione del vino”, <https://www.callmewine.com/blog/wine-academy/sommelier-tips/fermentazione-del-vino/>

https6: Controlling Biogenic Amines in Traditional Food Fermentations in Regional Europe, <https://cordis.europa.eu/project/id/211441/it>

https7: batteri, <https://www.izsvenezie.it/batteriocine-alternativa-antibiotici-campylobacter/>

https8: Bentonite, <https://www.enologonline.com/bentonite/>

https9: “Codice OIV delle buone pratiche vitivinicole atte a limitare al massimo la presenza di ammine biogene nei prodotti derivati dalla vite”, <https://www.oiv.int/public/medias/2768/oiv-cst-369-2011-it.pdf>