



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e  
Ambiente

Corso di laurea in Scienze e tecnologie alimentari

Il problema delle ammine biogene  
nei prodotti lattiero-caseari

Relatore  
Prof. Alessio Giacomini

Laureando  
Manuel Chinello

Matricola n. 1220841

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



# Indice

Riassunto .....	5
Abstract .....	6
1 Gli amminoacidi e le ammine biogene .....	7
1.1 Gli amminoacidi .....	7
1.2 Aspetti nutrizionali degli amminoacidi .....	8
1.3 Caratteristiche delle ammine biogene.....	9
1.4 Aspetti tossicologici delle ammine biogene .....	14
1.5 Il quadro normativo .....	18
2 Ammine biogene nei prodotti lattiero caseari .....	19
2.1 Fattori che influenzano l'accumulo di ammine biogene nei prodotti lattiero caseari.....	21
2.1.1 Microrganismi produttori di ammine biogene .....	21
2.1.2 Colture starter .....	21
2.1.3 Pastorizzazione .....	22
2.1.4 pH .....	23
2.1.5 Temperatura.....	24
2.1.6 Cloruro di sodio .....	25
2.1.7 Processi post-maturazione .....	26
2.2 Ammine biogene nei formaggi .....	27
2.2.1 Distribuzione delle ammine biogene all'interno della forma di formaggio.....	27
2.2.2 Distribuzione delle ammine biogene in differenti tipi di formaggio e prodotti lattiero caseari	28
3 Metodi di analisi delle ammine biogene .....	32
4 Misure di prevenzione e controllo .....	34
4.1 Radiazioni.....	34
4.2 Utilizzo di ceppi starter selezionati .....	35
4.3 Utilizzo di additivi.....	39
5 Conclusioni .....	41
6 Bibliografia .....	44



## Riassunto

Le ammine biogene sono composti tossici prodotti da microrganismi come batteri, lieviti e muffe come risultato della decarbossilazione di alcuni amminoacidi. I microrganismi responsabili della produzione di ammine biogene non sono necessariamente patogeni, tanto che alcuni sono batteri lattici che, allo stesso tempo, presentano delle proprietà probiotiche.

I fattori determinanti nella formazione delle ammine biogene sono la disponibilità di amminoacidi liberi nell'alimento e la presenza di microrganismi dotati di enzimi decarbossilasici (amminoacido-decarbossilasi). Da un lato, le ammine biogene e i loro derivati costituiscono mediatori chimici, neurotrasmettitori, ormoni oppure intermedi metabolici utilizzati per la sintesi di molecole più complesse o di organelli cellulari; dall'altro lato, invece, un'eccessiva assunzione di ammine biogene con la dieta può portare a delle reazioni avverse anche di importante entità. A tal scopo, al fine di tutelare la sicurezza alimentare, è importante indagare la formazione di ammine biogene associata all'attività microbica e la complessiva esposizione dei consumatori alle diverse fonti di queste sostanze. Tuttavia, la presenza di bioammine nei prodotti lattiero-caseari e il loro possibile coinvolgimento in intossicazioni alimentari sono stati per molto tempo trascurati; di conseguenza, l'implementazione delle misure di controllo in merito a queste sostanze non è ancora stata considerata tra le priorità delle autorità che si occupano di sicurezza alimentare e, dal punto di vista legale, la situazione normativa è ancora in via di sviluppo.

Dal momento che gli effetti negativi delle ammine biogene sono stati provati, le strategie tecnologiche che mirano alla riduzione di questi composti negli alimenti coinvolti, tra cui i prodotti lattiero caseari, dovrebbero essere oggetto di ricerca scientifica. Il presente elaborato descrive i principali fattori associati sia alla materia prima che ai processi di trasformazione legati alla produzione delle ammine biogene nei prodotti lattiero caseari. Inoltre, sono descritte alcune importanti strategie innovative che mirano alla prevenzione e al controllo dell'accumulo di tali composti.

## Abstract

Biogenic amines are organic compounds commonly produced by microorganisms such as bacteria, molds and yeasts. These compounds can usually be found in food and are formed through the decarboxylation of amino acids. Microorganisms producing biogenic amines are not necessarily pathogenic and some of them are lactic acid bacteria with probiotic properties.

Factors determining the formation of biogenic amines include the availability of free amino acids and the presence of microorganisms that can carry out the decarboxylation process. On one hand, biogenic amines are crucial in humans for maintaining both cell viability (some biogenic amines are also neurotransmitters) and the proper course of the organism's metabolic processes such as protein and hormone synthesis. On the other hand, an excessive amount of biogenic amines can be toxic, thus causing diarrhea, vomiting, sweating or tachycardia. However, the incidence of biogenic amines in dairy products and their possible implication in serious dairy-borne intoxications have long been overlooked. Consequently, the implementation of control measures has not been considered among the priorities of the food safety authorities.

Considering the negative effects of amines on living organisms, the reduction of these compounds should be the subject of scientific research. This work aims to describe the main factors associated with the raw material as well as the different technological processes affecting biogenic amine formation in dairy foods. Furthermore, some innovative strategies are described as important preventive or control measures to be recommended to operators working in the dairy sector.

# 1 Gli amminoacidi e le ammine biogene

## 1.1 Gli amminoacidi

Gli amminoacidi sono molecole organiche con formula generica  $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$ , contenenti un gruppo funzionale amminico ( $-\text{NH}_2$ ) e uno carbossilico ( $-\text{COOH}$ ) legati allo stesso atomo di carbonio, definito carbonio  $\alpha$ . Inoltre, allo stesso atomo di carbonio è legata una catena laterale ( $-\text{R}$ ) specifica per ciascun differente amminoacido. Tuttavia, esistono anche alcuni amminoacidi che non presentano una struttura con i sostituenti legati al carbonio  $\alpha$  e, tra questi, un esempio è l'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA). Gli amminoacidi ordinari sono 20 e vengono classificati in tre principali gruppi sulla base della polarità delle catene laterali (gruppi R):

- 1) Gruppi R non polari (9): a questi amminoacidi appartengono la glicina (Gly), l'alanina (Ala), la valina (Val), la leucina (Leu) e l'isoleucina (Ile), che presentano catene laterali idrocarburiche alifatiche di diversa lunghezza, che variano dai gruppi metilici (Ala) ai gruppi butilici (Leu); la metionina (Met), caratterizzata da una catena laterale contenente un etere tiolico; la prolina (Pro), l'unico amminoacido a presentare una struttura eterociclica che le conferisce rigidità. Infine, tra gli amminoacidi apolari ve ne sono due che contengono gruppi laterali aromatici: la fenilalanina (Phe) e il triptofano (Trp).
- 2) Gruppi R polari non carichi (6): a questi amminoacidi appartengono la serina (Ser) e la treonina (Thr), che hanno gruppi R di dimensioni diverse con gruppi ossidrilici; l'asparagina (Asn) e la glutammina (Gln), che presentano una catena laterale di diversa lunghezza con un gruppo amidico terminale; la tirosina (Tyr), che presenta un gruppo fenolico; la cisteina (Cys), che possiede un gruppo tiolico.
- 3) Gruppi R polari e carichi (5): questi amminoacidi sono basici e acidi. Gli amminoacidi basici presentano cariche positive ad un pH fisiologico (6-7) e comprendono la lisina (Lys), l'arginina (Arg) e l'istidina (His). Infine, gli amminoacidi acidi sono l'acido aspartico (Asp) e l'acido glutammico (Glu); questi amminoacidi sono carichi negativamente a valori di pH superiori a 4.

## 1.2 Aspetti nutrizionali degli amminoacidi

Gli amminoacidi occupano un ruolo fondamentale nell'organismo umano in quanto devono soddisfare la richiesta di sintesi proteica e devono entrare anche in altre vie metaboliche. Infatti, all'interno dell'organismo esiste un *turn-over* tra gli amminoacidi che derivano dalla degradazione delle proteine, dalla sintesi di nuove proteine e dalla sintesi di nuovi amminoacidi. Gli amminoacidi devono essere forniti tramite la dieta in adeguata quantità perché, anche se l'organismo riesce a sintetizzarne la maggior parte per costruire le proteine, non è in grado di costruirne altri. Per questo motivo, questi ultimi amminoacidi vengono definiti essenziali e devono essere introdotti attraverso gli alimenti. Tra gli amminoacidi essenziali sono compresi leucina, isoleucina, triptofano, tirosina, valina, metionina e fenilalanina; invece, gli amminoacidi arginina e istidina risultano essenziali solamente durante lo sviluppo (Amaya-Farfan, 2003). Inoltre, recenti scoperte suggeriscono anche che l'implementazione di arginina può esplicare una funzione protettiva contro gli attacchi dei ROS, le specie reattive dell'ossigeno (Lass *et al.*, 2002).


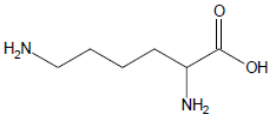
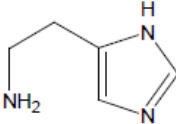
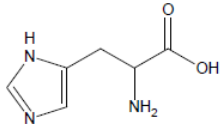
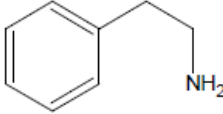
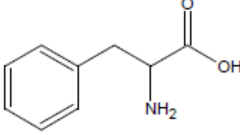
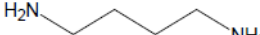
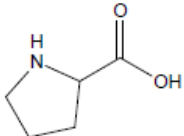
La maggior parte degli amminoacidi importanti per la nutrizione esistono come L-isomeri, tanto che le proteine naturali sono proprio realizzate esclusivamente da L-amminoacidi; tuttavia, durante la trasformazione alimentare, i L-amminoacidi possono essere racemizzati a D-isomeri (Masters *et al.*, 1979). La racemizzazione di residui L-amminoacidi a D-isomeri negli alimenti dipende essenzialmente dal pH, dal tempo e dalla temperatura di trattamento. Inoltre, i D-amminoacidi possono anche essere sintetizzati da alcuni microrganismi (Friedman, 2012).

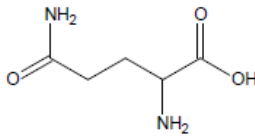
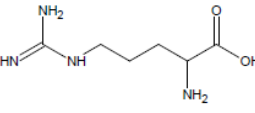
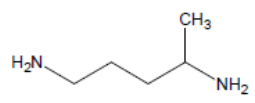
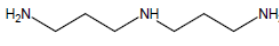
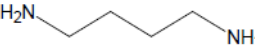
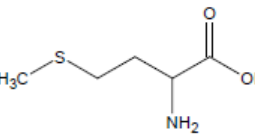
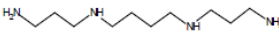
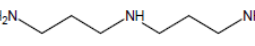
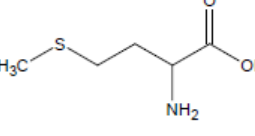
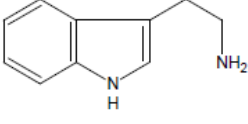
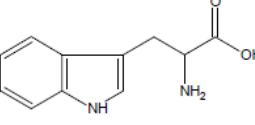
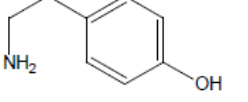
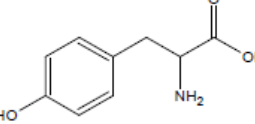


### 1.3 Caratteristiche delle ammine biogene

Gli aminoacidi rappresentano i precursori delle ammine biogene (AB), definite in tal modo in quanto dotate di una certa attività biologica. Le ammine biogene sono composti organici a basso peso molecolare contenenti azoto derivanti principalmente dalla decarbossilazione degli aminoacidi (tabella 1.1). Tali composti sono sintetizzati in tutti gli organismi viventi a partire dai relativi precursori aminoacidici attraverso vie metaboliche che di solito comportano decarbossilazione (Kusano *et al.*, 2008). L'enzima responsabile è una decarbossilasi che ha come cofattore il coenzima piridossal-fosfato, principale trasportatore di gruppi amminici. La figura 1.1 descrive la biosintesi delle principali ammine biogene riscontrate negli alimenti. Sebbene questi composti siano prodotti naturalmente dalle piante, dagli animali e dai microrganismi, il consumo di cibi contenenti un quantitativo elevato di ammine biogene potrebbe avere delle conseguenze di tipo tossicologico (Shalaby, 1996). Queste problematiche sono più gravi nei consumatori il cui il sistema di detossificazione è meno efficiente, sia a causa della costituzione genetica che di trattamenti di tipo farmacologico. Le ammine biogene, inoltre, possono originarsi anche dall'amminazione riduttiva e dalla transaminazione di aldeidi e chetoni, oltre che dall'attività dei tessuti corporei (Wojcich *et al.*, 2020).

**Tabella 1.1** – Caratteristiche e struttura delle principali ammine biogene.

Simbolo	Nome	Struttura	AA precursore
CAD	Cadaverina		Lisina 
HIS	Istamina		Istidina 
PEA	Feniletilamina		Fenilalanina 
PUT	Putrescina		Prolina 

			<p><b>Arginina</b></p>  <p><b>Glutammina</b></p>  <p><b>Ornitina</b></p> 
SPD	Spermidina		<p><b>PUT</b></p>  <p><b>Metionina</b></p> 
SPM	Spermina		<p><b>SPD</b></p>  <p><b>Metionina</b></p> 
TRA	Triptamina		<p><b>Triptofano</b></p> 
TYA	Tiramina		<p><b>Tirosina</b></p> 

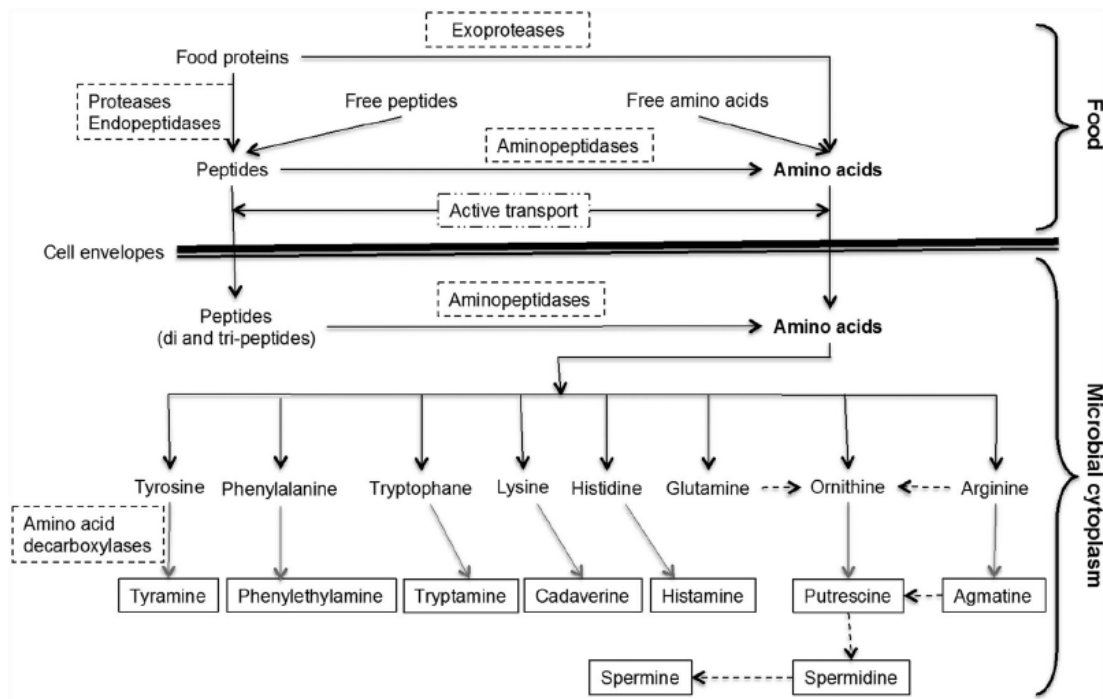
Le ammine biogene si trovano normalmente in prodotti alimentari ricchi di proteine e soggetti a fermentazione, oppure in quei prodotti a lunga maturazione. I prodotti lattiero caseari, specialmente i formaggi, possono accumulare ammine biogene, con concentrazioni che variano da quantità in tracce fino a più di 1000 mg/kg di prodotto. Inoltre, anche vegetali, frutta, cioccolata e uova possono contenere ammine biogene (Wojcich *et al.*, 2020). Normalmente, le scorrette prassi igieniche favoriscono un elevato contenuto di ammine biogene negli alimenti, tanto che il loro livello è considerato come un indicatore della freschezza e della contaminazione microbica dei cibi (Rabie *et al.*, 2011). Infatti, le uniche due ammine presenti naturalmente nei cibi sono spermina e spermidina, mentre le altre si accumulano negli alimenti a seguito dell'azione microbica e, per tale motivo, vengono utilizzate per determinare la qualità microbiologica dei cibi. Nello specifico, ci si avvale di due indici: *QI (Quality Index)* e *BAI (Biogenic Amine Index)*. Il *QI* è definito come la somma della concentrazione di istamina, putrescina e cadaverina divisa per la somma della concentrazione di spermina e spermidina più uno (Mietz e Karmas, 1978; Rabie *et al.*, 2014). Il *BAI* è invece ottenuto dalla somma della concentrazione di putrescina, cadaverina, istamina e tiramina.

$$QI = \frac{C_{Putrescine} + C_{Cadaverine} + C_{Histamine}}{1 + C_{Spermine} + C_{Spermidine}}$$

$$BAI = C_{Putrescine} + C_{Cadaverine} + C_{Histamine} + C_{Tyramine}$$

Sulla base dei risultati ottenuti grazie agli indici riportati, i singoli prodotti alimentari vengono divisi in tre categorie: 1-accettabile; 2-in via di deterioramento; 3-deteriorato. Tuttavia, l'indice *QI* è principalmente legato ai prodotti della pesca e non può essere utilizzato efficientemente nel caso dei prodotti a base di carne poiché questi ultimi tendenzialmente contengono più tiramina. Invece, l'indice *BAI* può essere utilizzato anche per determinare la qualità dei prodotti carnei.

Le ammine biogene possono essere classificate in vari modi. Sulla base della struttura chimica, esse possono essere suddivise in alifatiche (putrescina, cadaverina, spermina e spermidina), aromatiche (tiramina, feniletilammina) o eterocicliche (istamina, triptamina). Inoltre, sulla base del numero di gruppi amminici, esse possono essere suddivise in monoammine (tiramina, feniletilammina), diammine (putrescina, cadaverina) e poliammine (spermina, spermidina). Alcuni autori affermano che, dal momento che le poliammine sono prodotte attraverso un processo di condensazione seguito da una decarbossilazione, queste ultime non dovrebbero essere classificate come ammine biogene (Bardócz, 1999).



**Figura 1.1** – Formazione di ammine biogene negli alimenti come risultato dell’attività microbica. Le frecce grigie rappresentano le reazioni di decarbossilazione che portano direttamente alla formazione delle BA, mentre quelle tratteggiate indicano le ammine biogene prodotte attraverso vie metaboliche che differiscono dalla semplice decarbossilazione (Ruiz-Capillas e Jimenez-Colmenero, 2005).

Nelle cellule eucariotiche, la sintesi delle ammine biogene è essenziale poiché questi composti agiscono come precursori per la sintesi degli ormoni, degli acidi nucleici e delle proteine (Premont *et al.*, 2001). Alcune ammine biogene ricoprono un importante ruolo come neurotrasmettitori, mentre altre, come la putrescina e la spermidina, sono necessarie ad alcune funzioni biologiche, come la modulazione del DNA, dell’RNA e la sintesi proteica. Nelle cellule procariotiche, invece, il ruolo fisiologico della sintesi delle ammine biogene sembra legato principalmente alla resistenza agli ambienti acidi. La produzione di ammine biogene in risposta allo stress acido è stata infatti studiata in *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium e *Vibrio vulnificus*, in grado di produrre cadaverina (Park *et al.*, 1996; Rhee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007). La decarbossilazione, nello specifico, incrementa le possibilità di sopravvivenza in condizioni di acidità (Rhee *et al.*, 2002) attraverso il consumo di protoni e l’escrezione di ammine e CO<sub>2</sub>, aiutando così a ristabilire il pH esterno (Silla Santos, 1996; Schelp *et al.*, 2001; van de Guchte *et al.*, 2002).

La produzione di ammine biogene può anche rappresentare una via per l’ottenimento di energia; infatti, l’antiporto ammina/amminoacido può portare alla generazione di una forza proton motrice (Molenaar *et al.*, 1993). Questa funzione è particolarmente importante per i batteri lattici carenti di un’efficiente catena di trasporto degli elettroni in grado di generare elevati quantitativi di ATP (Vido *et al.*, 2004). La produzione di ammine biogene può inoltre mediare altre funzioni fisiologiche

nei batteri, come le risposte agli stress ossidativi e osmotici (Schiller *et al.*, 2000; Tkachenko *et al.*, 2001). Altre funzioni fisiologiche legate alle principali ammine biogene sono riassunte nella tabella 1.2.

**Tabella 1.2** – Funzioni fisiologiche delle principali ammine biogene (Schirone *et al.*, 2022).

Amino acid	Biogenic amine	Number of amine groups	Chemical structure	Biosynthetic pathway	Physiological function	Reference
Tyrosine	Tyramine	Monoamine	Aromatic	Tyrosine decarboxylase	Vasoconstriction, hypertension, noradrenalin secretion	Benkerroum (2016)
Phenylalanine	Phenylethylamine	Monoamine	Aromatic	Tyrosine decarboxylase	Vasoconstriction, hypertension, neurotransmission	Kaur and Kumari (2016)
Histidine	Histamine	Diamine	Heterocyclic	Histidine decarboxylase	Immune system response, gastric acid secretion, vasodilatation, hypotension, neurotransmission	Nakamura, Ishimaru, Shibata, and Nakao (2017)
Tryptophan	Tryptamine	Diamine	Heterocyclic	Aromatic L-amino decarboxylase	Vasoconstriction, hypertension, neurotransmission	Tittarelli, Mannocchi, Pantano, and Romolo (2015)
Tryptophan	Serotonin	Diamine	Heterocyclic	Tryptophan hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase	Neurotransmission, appetite, sleep and mood disorder regulation	Zhang, Yan, Luo, Huang, and Rao (2018)
Lysine	Cadaverine	Diamine	Aliphatic	Lysine decarboxylase	Growth regulation, diamine and polyamine formation	Jairath, Singh, Dabur, Rani, and Chaudhari (2015)
Arginine	Agmatine	Polyamine	Aromatic	Arginine decarboxylase	Nitric oxide synthesis, blood glucose regulation, polyamine metabolism	Demady, Jianmongkol, Vuletich, Bender, and Osawa (2001)
Ornithine	Putrescine	Diamine	Aliphatic	Ornithine decarboxylase	Hypotension, cellular growth or division, anti-depression	Valdés-Santiago and Ruiz-Herrera (2013)
Agmatine*	Spermine	Polyamine	Aliphatic	Agmatine deiminase	Cellular metabolism, intestinal tissue development	Medina, Urdiales, Rodríguez-Caso, Ramirez, and Sanchez-Jimenez (2003)
Putrescine*	Spermidine	Polyamine	Aliphatic	Spermidine synthase	Biological processes regulation, intestinal tissue development	

\* An asterisk (\*) indicates biogenic amine.

## 1.4 Aspetti tossicologici delle ammine biogene

Sebbene le ammine biogene siano necessarie a svolgere determinate funzioni biologiche, il consumo di alimenti che ne contengono un'elevata quantità può avere conseguenze di tipo tossicologico a livello del sistema vascolare e nervoso. Dopo il consumo di cibi contenenti ammine biogene, una piccola quantità di tali sostanze viene metabolizzata in sostanze fisiologicamente meno attive a livello dell'intestino, grazie agli enzimi amino-ossidasi (monoamino-ossidasi, MAO, e diamino-ossidasi, DAO). L'istamina può essere anche detossificata attraverso la metilazione (attraverso l'azione della metiltransferasi) (Taylor e Sumner, 1986), oppure può essere acetilata (Lehane e O'Leary, 2000). In ogni caso, l'assunzione di cibi ricchi in ammine biogene o la loro inadeguata detossificazione (per ragioni di tipo genetico oppure a seguito dell'assunzione di medicine o alcol) (Bodmer *et al.*, 1999) può portare ad un innalzamento del livello di AB a livello del sangue, il che può causare il rilascio di adrenalina e noradrenalina, provocando così sintomatologie come tachicardia, emicrania ed elevata pressione arteriosa (Shalaby, 1996) (figura 1.2). Premont *et al.* (2001) affermano inoltre che i livelli di ammine biogene nel sangue possono essere più elevati in pazienti affetti da morbo di Parkinson, schizofrenia e depressione.

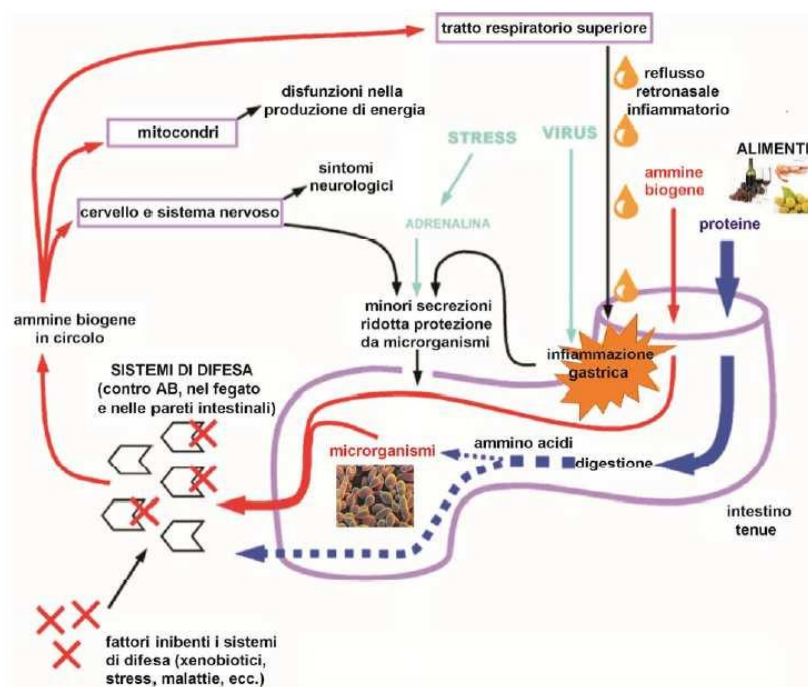


Figura 1.2 – Rappresentazione schematica dell'azione delle ammine biogene dopo l'ingestione.

Ad alte concentrazioni, le ammine biogene possono indurre mal di testa, difficoltà respiratorie, palpitazioni, iper- o ipotensione, in particolare se accumulate con i differenti alimenti o se assunte da soggetti che risultano essere sensibili a queste sostanze oppure soffrono di specifiche patologie o sono sottoposti a particolari terapie che influenzano il normale metabolismo (Spano *et al.*, 2010). Un'eccessiva introduzione di ammine biogene con l'alimentazione può inoltre provocare sintomi

simili ad una reazione allergica, come diarrea, mal di testa, rinocongiuntivite, asma, ipotensione, aritmia, orticaria, prurito, arrossamento, ecc. (Maintz e Novak, 2007).

Sebbene sia difficile stabilire un livello di tossicità specifico per le ammine biogene a causa della variabilità dovuta alle caratteristiche dei singoli individui, Wöhrl *et al.* (2004) affermano che 75 mg di istamina pura liquida somministrata per via orale può provocare sintomi immediati nel 50% dei soggetti sani e privi di intolleranze. Un ulteriore problema nella determinazione dei livelli di tossicità delle ammine biogene è il loro effetto sinergico; ad esempio, alcuni studi condotti in ratti hanno dimostrato che la cadaverina e altre ammine agiscono come potenziatori dell'effetto tossico dell'istamina. Infatti, queste ammine agiscono come inibitori delle diamino-ossidasi (Lehane e O'Leary, 2000) e la loro presenza a livello di alcuni formaggi stagionati spiega perché l'assunzione di una certa quantità di tali alimenti provochi un effetto più tossico rispetto all'assunzione di una pari quantità di istamina in soluzione acquosa (Taylor e Sumner, 1986).

Le ammine secondarie come la putrescina e la cadaverina possono reagire con i nitriti per formare nitrosammine con effetto cancerogeno (Ten Brink *et al.*, 1990): il rischio legato alla formazione di questi composti è maggiormente elevato qualora si consumino prodotti ricchi in ammine biogene e nitriti o nitrati, composti utilizzati solitamente come conservanti. Inoltre, il riscaldamento di questi prodotti incrementa il rischio di reazione tra le ammine biogene con i composti azotati a formare le sostanze carcinogene citate precedentemente (Ruiz-Capillas e Herrero, 2019). Infine, è stato dimostrato che la presenza di tiramina è in grado di incrementare la capacità di aderenza alla mucosa intestinale da parte di ceppi di *Escherichia coli* enteropatogeni (Lyte, 2004).

In generale, si può dire che le ammine biogene siano riconosciute come gli agenti causali di moltissimi episodi di intossicazione alimentare, la maggior parte dei quali sono causati dall'istamina. Nello specifico, l'intossicazione alimentare causata dall'istamina è definita sindrome sgombroide (*HFP – Histamine Fish Poisoning*), in quanto è per lo più associata al consumo di pesce appartenente alla famiglia delle Scombridae (Taylor, 1985), contaminato da ammine biogene e che comunque può non presentare alterazioni organolettiche. La sindrome è dovuta alla tossicità dell'istamina per effetto del suo legame ai recettori cellulari di membrana negli apparati respiratorio, cardiocircolatorio, gastroenterico e del sistema immunitario. Nel caso dei formaggi, invece, l'intossicazione da ammine biogene è causata prevalentemente da elevati livelli di tiramina e, in questo caso, si parla di “*cheese reaction*” (Silla Santos, 1996). Questo termine fu coniato negli anni Sessanta dello scorso secolo, in quanto fu dimostrata una stretta relazione tra l'insorgenza di emicrania e l'ingestione di cibi ricchi in tiramina in alcuni soggetti. Inoltre, è stato constatato che in alcuni pazienti trattati con MAO inibitori (inibitori delle monoamino-ossidasi) l'eccessiva quantità di tiramina non può essere

metabolizzata e, comportandosi come simpaticomimetico, è in grado di provocare crisi ipertensive. Tuttavia, nell'uomo sano, per innalzare la pressione sanguigna di almeno 30 mmHg è necessaria una somministrazione orale media di 500 mg/kg di tiramina (Ladero *et al.*, 2010), mentre le donne sembrano essere più sensibili a questa ammina biogena e la quantità necessaria per ottenere lo stesso effetto è più bassa. In ogni caso, una concentrazione pari a 125 mg/kg di tiramina è considerata tossica nei soggetti sani, tanto che è stato proposto un valore soglia di 100 mg/kg di tiramina (Ladero *et al.*, 2010); tuttavia, negli individui che assumono MAO inibitori, anche solamente il consumo di un quantitativo pari a 6 mg di tale sostanza può portare a reazioni di intossicazione, con sintomatologie che possono manifestarsi anche poche ore dopo l'assunzione dell'alimento e comprendono emicrania, problemi gastrointestinali e tachicardia. Per quanto riguarda la tiramina, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha suggerito un valore limite di 600 mg/persona/pasto, anche se comunque tale valore dev'essere 100 volte inferiore per i soggetti sotto trattamento con MAO inibitori (EFSA, 2011).

Inoltre, è stato dimostrato che l'interazione tra etanolo e ammine sembra essere sinergica; infatti, l'etanolo è in grado di inibire alcuni enzimi intestinali come le monoamino-ossidasi (MAO) coinvolte nella detossificazione delle ammine biogene. Inoltre, l'alcol e l'acetaldeide sono in grado di far aumentare gli effetti tossici delle ammine biogene aumentando anche la permeabilità della parete intestinale nei confronti di questi composti (Smit *et al.*, 2008). Questo effetto è di particolare importanza nelle bevande fermentate contenenti alte concentrazioni di ammine biogene, o quando alimenti contenenti ammine biogene vengono consumati con bevande alcoliche di accompagnamento (Wöhrl *et al.*, 2004; Silla-Santos *et al.*, 1996).

Alcune ammine biogene, come putrescina e cadaverina (rispettivamente ottenute per decarbossilazione di ornitina e lisina), una volta assunte possono reagire con i nitriti per formare le nitrosammine, composti cancerogeni (Ten Brink *et al.*, 1990). Inoltre, alcuni studi condotti sui ratti hanno dimostrato che la tiramina, in presenza di sodio nitrito, è in grado di trasformarsi in 3-diazotiramina, un composto cancerogeno (Gawarska *et al.*, 2012).

Secondo i dati riportati nel report scientifico europeo “*The European Union One Health Zoonoses Report*” riguardante il 2020, durante quest'ultimo anno otto stati membri (Belgio, Croazia, Francia, Germania, Italia, Malta, Spagna e Svezia) hanno riportato 43 *outbreaks* causati da intossicazione da istamina, i quali sono sfociati in 183 casi, 17 ospedalizzazioni e una morte (tabella 1.3). Tuttavia, gli *outbreaks* dovuti all'istamina sono notevolmente diminuiti nel corso del 2020 rispetto all'anno precedente (96 *outbreaks* nel 2019, 55,2% in più), soprattutto a causa del fatto che la pandemia do-

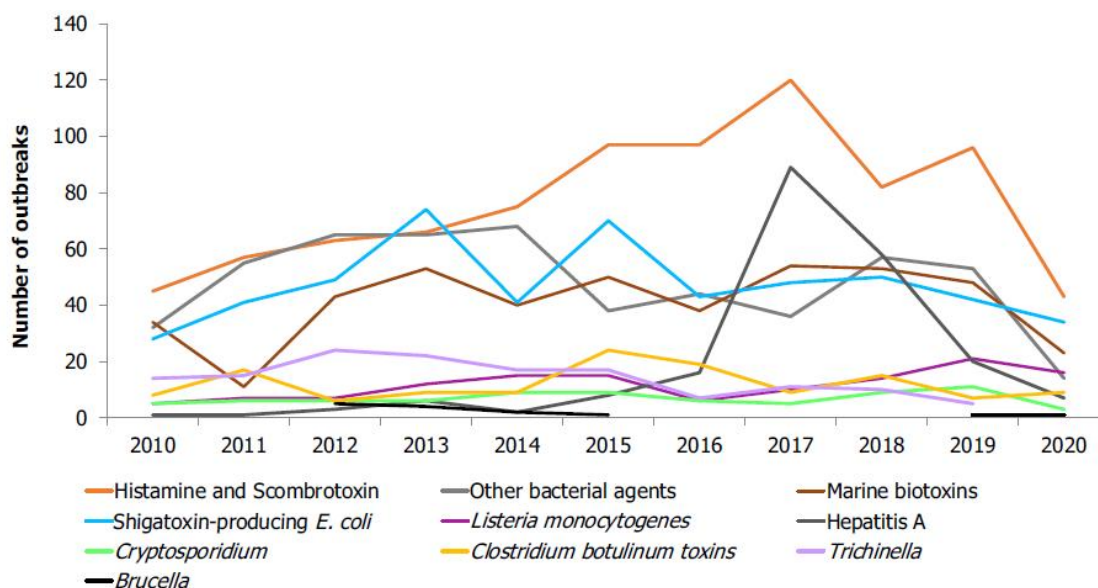


vuta al Covid-19 ha inevitabilmente sospeso la maggior parte delle attività di catering e di somministrazione di pasti in luoghi come le mense scolastiche e aziendali.

**Tabella 1.3** – Numero di *outbreak*, casi, ospedalizzazioni e morti causati da vari agenti negli Stati Membri EU (EFSA, ECDC, 2021).

Type of Agent		Outbreaks					Cases of illness					
		Strong-evidence outbreaks	Weak-evidence outbreaks	Total outbreaks	% of total	Reporting rate per 100,000	Human cases		Hospitalisations		Deaths	
							N	Mean outbreak size (cases) and range (min-max)	N	% of cases	N	% of cases
<b>Parasites</b>	<i>Anisakis</i>	1	1	2	0.0	< 0.01	6	3 (-)	0	0.0	0	0
	<i>Cryptosporidium</i>	1	2	3	0.1	< 0.01	34	11.3 (2-25)	1	2.9	0	0
	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	1	0	1	< 0.01	< 0.01	77	77 (-)	0	0.0	0	0
	<i>Giardia</i>	0	2	2	0.1	< 0.01	4	2 (-)	0	0.0	0	0
	<i>Trichinella</i>	5	1	6	0.2	< 0.01	119	19.8 (2-79)	13	11	0	0
	<b>Subtotal</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>0.5</b>	<b>&lt; 0.01</b>	<b>240</b>	<b>17.1 (2-79)</b>	<b>14</b>	<b>5.8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Other causative agents</b>	Histamine and Scombrototoxin	14	29	43	1.4	0.01	183	4.3 (2-15)	17	9.3	1	1
	Marine biotoxins	1	22	23	0.7	0.01	120	5.2 (2-14)	6	5.0	0	0
	Other causative agents	2	1	3	0.1	< 0.01	55	18.3 (3-47)	0	0.0	0	0
	<b>Subtotal</b>	<b>17</b>	<b>52</b>	<b>69</b>	<b>2.2</b>	<b>0.02</b>	<b>358</b>	<b>5.2 (2-47)</b>	<b>23</b>	<b>6.4</b>	<b>1</b>	<b>0.3</b>
<b>Unknown</b>	Unknown / Unspecified <sup>(d)</sup>	17	1,212	1,229	39.8	0.27	6,139	5 (2-220)	166	2.7	1	< 0.1
<b>Total (EU)<sup>(e)</sup></b>		<b>248</b>	<b>2,838</b>	<b>3,086</b>	<b>100.0</b>	<b>0.69</b>	<b>20,017</b>	<b>6.5 (2-286)</b>	<b>1,675</b>	<b>8.4</b>	<b>34</b>	<b>100.0</b>

Tuttavia, come si può notare dal grafico riportato (figura 1.3), il numero di *outbreaks* dovuti a istamina registrati negli ultimi 10 anni è rilevante e il trend è generalmente crescente. Tuttavia, per l'interpretazione dei dati è importante considerare che i valori relativi agli *outbreaks* causati da agenti come l'istamina sono largamente sottostimati in quanto non coperti regolarmente dai programmi di sorveglianza nazionali.



**Figura 1.3** – Numero di *outbreak* causati da vari agenti negli Stati Membri EU dal 2010 al 2020 (EFSA, ECDC – 2021).

Per quanto riguarda i formaggi, nel 2003, la *Food Standards Agency* (FSA) segnalò episodi di intossicazione nei bambini di scuole inglesi, probabilmente attribuibili alla presenza di istamina in al-

cuni tipi di formaggio. Gli episodi divennero più frequenti (circa una ventina) tra il 2008 e il 2015 e le fonti individuate oppure sospette riguardarono formaggi a base di latte sia crudo che pastorizzato, con concentrazioni di istamina comprese tra 850 e 1870 mg/kg (EFSA, 2011). I casi rilevati dalla FSA riguardarono bambini di circa cinque anni di età che consumarono formaggi come il cheddar all'interno di alimenti come lasagne o maccheroni presso le mense delle scuole materne. Alcuni di questi episodi interessarono anche gli adulti, con sintomi simili ma più lievi in quanto il peso corporeo di questi ultimi è notevolmente differente rispetto a quello dei bambini.

## 1.5 Il quadro normativo

Attualmente, la legislazione in merito al contenuto di ammine biogene negli alimenti è ristretta. Infatti, mentre nel caso dei prodotti ittici esistono chiari limiti riguardanti il contenuto di istamina (European Union Commission (EC) n°2073/2005, n°1441/2007, n°365/2010; Food and Drug Administration USA (FDA, 2001)), nel caso di altri alimenti i contenuti sono soltanto raccomandati o suggeriti (ad esempio, 100 mg di istamina per kg di alimento, oppure 2 mg di istamina per litro di bevanda alcolica) (Linares *et al.*, 2011). Nel caso dell'istamina nei prodotti ittici, questi ultimi vengono suddivisi essenzialmente in due categorie: pesci e prodotti a base di pesce, con un livello massimo di istamina pari a 200 mg/kg; prodotti a base di pesce soggetti a maturazione enzimatica, con un livello massimo di istamina pari a 400 mg/kg. I prodotti della pesca, freschi e in salamoia, sottoposti a criteri di sicurezza alimentare per l'istamina appartengono alle famiglie *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphenidae*, *Pomatomidae* e *Scombreresosidae*. Nonostante i timori legati all'impatto sulla salute, non esistono dei limiti di legge per quanto riguarda il tenore massimo di ammine biogene a livello dei vini; infatti, nemmeno l'OIV (*Organization Internationale de la Vigne et du Vin*) ha fissato dei limiti massimi applicabili ai vini. Dai vari studi è infatti emerso che è effettivamente più utile indicare il valore massimo del contenuto totale di ammine biogene negli alimenti, piuttosto che il valore di una singola ammina.

Nel caso della tiramina, si raccomanda un limite massimo compreso tra 100 e 800 mg/kg di alimento, che si abbassa a 30 mg/kg nel caso della  $\beta$ -fenilettilammina (Ten Brink *et al.*, 1990; Halász *et al.*, 1994). Sebbene sia necessaria più ricerca, si afferma generalmente che il contenuto di ammine biogene negli alimenti debba essere mantenuto ai livelli minimi, ove possibile.

## 2 Ammine biogene nei prodotti lattiero caseari

La presenza e l'accumulo di ammine biogene negli alimenti dipende da vari fattori, tra cui la disponibilità di amminoacidi; questi ultimi, infatti, sono i precursori della sintesi delle ammine biogene e possono essere naturalmente presenti nel latte oppure possono essere rilasciati dalle proteine a seguito dell'azione proteolitica. Quest'attività proteolitica che porta alla formazione degli amminoacidi può essere originata da: ceppi di batteri lattici con attività proteolitica presenti nel prodotto lattiero caseario; plasmina, proteasi termostabile nativa del latte; enzimi con attività proteolitica utilizzati nella caseificazione; altre proteasi liberate a partire dalle cellule somatiche del latte (Tsakalidou 2011; Calzada *et al.*, 2013). Successivamente, i microrganismi produttori di ammine biogene possono partire dagli amminoacidi formati a seguito di tali reazioni per produrre questi composti potenzialmente tossici, che verranno poi rilasciati a livello della matrice del prodotto lattiero caseario.

A tal proposito, dev'essere osservato che, sebbene i microrganismi contaminanti dei prodotti lattiero caseari come le *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* siano anche i principali produttori di ammine biogene, questi ultimi non sono gli unici responsabili dell'accumulo di tali sostanze. Infatti, i batteri lattici delle colture starter e non starter utilizzate durante la caseificazione sono i principali microrganismi produttori di ammine biogene a livello del prodotto finito (Spano *et al.*, 2010; Linares *et al.*, 2011). Ceppi di lattobacilli, enterococchi, lattococchi, pediococchi, streptococchi e *Leuconostoc* sono infatti associati a elevati livelli di ammine biogene nei formaggi e negli altri prodotti lattiero caseari (tabella 2.1); inoltre, alcuni studi di tipo genetico hanno dimostrato che molti di questi ceppi possiedono geni o operoni che codificano per enzimi decarbossilasici o altre tipologie di enzimi coinvolti in varie *pathway* di biosintesi delle bioammine (Komprda *et al.*, 2008; Nout, 1994; Koutsoumanis *et al.*, 2010). Inoltre, occorre considerare che alcuni batteri potenzialmente in grado di produrre ammine biogene possono raggiungere il prodotto attraverso le contaminazioni che normalmente avvengono durante i processi produttivi.

Dunque, alcune specie di lievito che contribuiscono alla fermentazione o alla maturazione di alcune tipologie di formaggi e latti fermentati sono in grado di produrre ammine biogene (Benkerroum e Tamime, 2004) (tabella 2.1). Infatti, i formaggi rappresentano un ambiente ideale per la produzione e l'accumulo di questi composti potenzialmente tossici, proprio perché i principali fattori che ne favoriscono la formazione sono solitamente a livelli ottimali. Infatti, oltre alla disponibilità di amminoacidi liberi e di microrganismi dotati di attività decarbossilasica, i formaggi e i prodotti lattiero caseari in genere presentano solitamente adeguati livelli di pH, temperatura e attività dell'acqua (Aw). Inoltre, la sufficiente disponibilità di piridossalfofosfato, un cofattore richiesto per l'attività dell'amminoacido decarbossilasi (Edwards e Sandine, 1981), e la presenza di un pH prossimo a 5.0-

6.5, danno origine ad un ambiente favorevole per la formazione di ammine biogene a livello dei formaggi. Il livello di attività dell'acqua presente nei formaggi (tendenzialmente da 0,90 a 1,00) è altresì ottimale per la crescita dei batteri produttori di ammine biogene (Marcos, 1993), sebbene tale parametro tenda a diminuire man mano che la maturazione procede. Inoltre, le normali temperature di fermentazione (25-44°C) e di maturazione (10-20°C) dei formaggi favoriscono la proteolisi e la formazione di ammine biogene, la quale può proseguire anche quando i formaggi vengono conservati in regime di refrigerazione, dal momento che esistono alcuni ceppi produttori di ammine biogene con comportamento psicrofilo e psicrotrofo (ad esempio *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp.).

Durante la fermentazione l'attività proteolitica è importante per l'approvvigionamento di energia, di carbonio, di aminoacidi e azoto, tutti composti essenziali per lo sviluppo e la crescita delle colture starter, le quali portano conseguentemente ad un'acidificazione del latte attraverso la fermentazione stessa. Durante il processo di maturazione, invece, la proteolisi e la lipolisi provocate dai batteri lattici starter, non starter, dalle muffe e dai lieviti sono fondamentali per lo sviluppo delle caratteristiche organolettiche e strutturali dei formaggi.

**Tabella 2.1** – Principali microrganismi produttori di ammine biogene nei prodotti lattiero caseari (Linares et al., 2012).

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) Marino et al. (2000), Coton et al. (2011) Martín et al. (2005), Burdychova and Komprda (2007), Calles-Enriquez et al. (2010)
	Gram negative	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Morganella morganii</i>	
	Gram positive	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	
Tyramine	Molds and yeast	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Gardini et al. (2006) 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)
	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> .	
Putrescine	Molds and yeast	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Wyder et al. (1999) ten Brink et al. (1990), Coton et al. (2011) Llacer et al. (2007), Lucas et al. (2007), Ladero et al. (2011a,b)
	Gram negative	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Proteus</i> .	
	Gram positive	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	
Cadaverine	Molds and yeast	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Wyder et al. (1999) Meng and Bennett (1992), Marino et al. (2000), Coton et al. (2011)
	Gram negative	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Halomonas</i> sp., <i>Morganella</i> <i>morganii</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	
	Gram positive	–	
Tryptamine	Molds and yeast	–	Marino et al. (2000), Coton et al. (2011)
	Gram negative	<i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i>	
	Gram positive	–	
Phenylethylamine	Molds and yeast	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Wyder et al. (1999) Marino et al. (2000) Marcobal et al. (2006c)
	Gram negative	<i>Halomonas</i> , <i>Serratia</i>	
	Gram positive	<i>Enterococci</i>	

*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.*

## **2.1 Fattori che influenzano l'accumulo di ammine biogene nei prodotti lattiero caseari**

Come anticipato, la biosintesi e l'accumulo di ammine biogene nei prodotti lattiero caseari richiede la presenza di batteri caratterizzati da attività decarbossilasica e di condizioni ambientali adeguate alla loro crescita e all'attività degli enzimi, oltre che la presenza di amminoacidi da utilizzare come substrato.

### **2.1.1 Microrganismi produttori di ammine biogene**

La presenza di microrganismi in grado di produrre ammine biogene è un fattore indispensabile per la biosintesi di tali molecole potenzialmente tossiche. Tuttavia, questi microrganismi devono essere presenti in adeguata quantità e devono verificarsi determinate condizioni di lavorazione e di stoccaggio degli alimenti (Joosten and Northolt, 1987; Ladero *et al.*, 2008). Inoltre, è difficile riscontrare una correlazione tra la presenza di elevate concentrazioni di ammine biogene nei formaggi e l'aumento di uno specifico gruppo o popolazione di batteri lattici, soprattutto a causa del fatto che la capacità di produrre ammine biogene è ceppo-specifica e non specie-specifica (Novella Rodríguez *et al.*, 2002). Tuttavia, lo sviluppo di metodi molecolari specifici per la determinazione e quantificazione dei batteri produttori di ammine biogene nei prodotti lattiero caseari ha permesso di stabilire una relazione diretta tra il numero di microrganismi produttori e la concentrazione finale di sostanza rilevata nell'alimento (Ladero *et al.*, 2008). È stato inoltre dimostrato che la capacità di produrre ammine biogene dei batteri lattici è una caratteristica acquisita attraverso trasferimento genico orizzontale, quindi tramite plasmidi o elementi mobili (Lucas *et al.*, 2005; Marcobal *et al.*, 2006).

### **2.1.2 Colture starter**

Nella maggior parte dei processi di caseificazione industriali le colture starter vengono utilizzate allo scopo di assicurare una certa standardizzazione della qualità del prodotto finito. Alcuni batteri lattici generalmente utilizzati come colture starter, tuttavia, sono in grado di produrre ammine biogene. Il rischio legato alla produzione di ammine biogene da parte di ceppi starter utilizzati in caseificazione può essere minimizzato ricorrendo a colture starter ben caratterizzate. Molti ceppi di *Streptococcus thermophilus* (Calles-Enríquez *et al.*, 2010; La Gioia *et al.*, 2011), *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus curvatus* (Ladero *et al.*, 2011) ottenuti a partire da substrati lattiero caseari sono in grado di produrre istamina, tiramina e putrescina. È stato inoltre dimostrato che anche alcuni ceppi di *Lactobacillus* spp. isolati da formaggi stagionati sono in grado di produrre ammine biogene come la tiramina (Straub *et al.*, 1994; Arena *et al.*, 2007; Ladero *et al.*, 2011) e la putrescina (Ladero *et al.*, 2011).

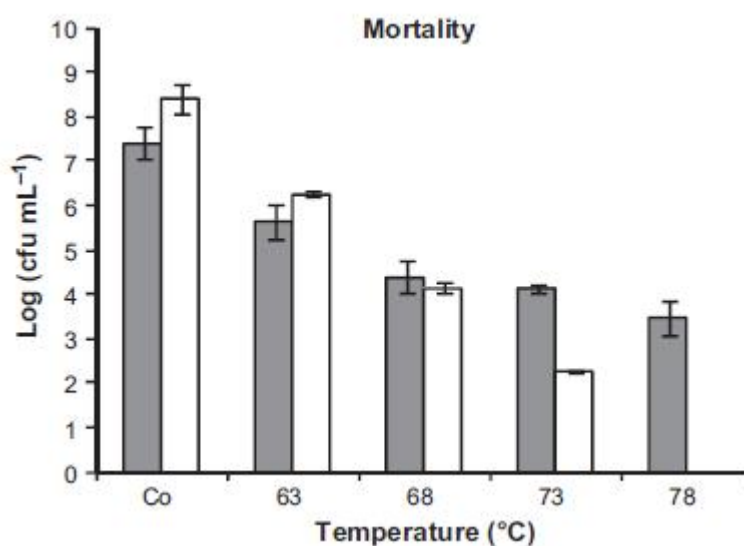
Queste dimostrazioni permettono di capire la necessità di includere l'incapacità di produrre ammine biogene tra le condizioni richieste ai ceppi che si intendono utilizzare come starter nelle produzioni lattiero casearie (Crow *et al.*, 2001; Linares *et al.*, 2011; EFSA Panel on Biological Hazards, 2011). Un altro approccio che mira a minimizzare l'accumulo di ammine biogene nei prodotti lattiero caseari riguarda l'utilizzo di colture starter caratterizzate da batteri in grado di degradare tali sostanze (Leuschner e Hammes, 1998; Naila *et al.*, 2010).

### 2.1.3 Pastorizzazione

Il latte è un alimento che fornisce tutti i nutrienti necessari alla crescita di diversi microrganismi, tanto che possono essere raggiunte cariche microbiche fino a  $10^7$  cfu/ml quando non vengono mantenute le adeguate condizioni di conservazione (Varnam e Sutherland, 1994). I principali gruppi microbici presenti all'interno del latte crudo sono batteri lattici mesofili come enterococchi, lattococchi, lattobacilli o *Leuconostoc*, oltre ad altri batteri come le *Enterobacteriaceae*; inoltre, possono essere presenti microrganismi psicrotrofi come *Pseudomonas* o *Acinetobacter* (Varnam e Sutherland, 1994; Muir e Banks, 2003; Martuscelli *et al.*, 2005; Serio *et al.*, 2007). Alcuni ceppi appartenenti ai suddetti gruppi e generi sono stati descritti come produttori di ammine biogene (Linares *et al.*, 2011). La pastorizzazione è un trattamento termico che è in grado di ridurre la carica microbica presente all'interno del latte crudo ed è storicamente utilizzata dall'industria alimentare allo scopo di aumentare la *shelf-life* dei prodotti lattiero caseari andando a ridurre la presenza di batteri deterioranti, patogeni e altri in grado di produrre composti tossici che potrebbero rendere i prodotti non sicuri per il consumo (Lewis, 2003). Di conseguenza, la pastorizzazione è anche in grado di ridurre la carica microbica di microrganismi produttori di ammine biogene; dunque, è stato dimostrato che i formaggi ottenuti da latte pastorizzato presentano un contenuto minore di ammine biogene rispetto a quelli ottenuti da latte crudo (Novella-Rodriguez *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2007; Naila *et al.*, 2010). Tuttavia, alcuni lattobacilli o enterococchi produttori di ammine biogene sono resistenti alla pastorizzazione e possono comunque produrre ammine biogene che si riscontreranno in seguito a livello del prodotto finito (Ladero *et al.*, 2011). Il grafico riportato nella figura 2.1 riguarda i risultati ottenuti a seguito dell'incremento della temperatura di pastorizzazione nei confronti di due ceppi produttori di ammine biogene: *Enterococcus durans* IPLA655 e *Lactobacillus curvatus* VI6. Nello specifico, i due ceppi sono stati sottoposti a pastorizzazioni con temperature di 63, 68, 73 e 78°C per un tempo pari a 30 minuti.

La pastorizzazione come tale non può essere considerata la soluzione al problema delle ammine biogene; infatti, alcuni autori hanno suggerito l'approccio "hurdle technology" (tecnologia ad ostacoli) al fine di risolvere la problematica, combinando il processo termico con altri trattamenti come

le elevate pressioni (Novella-Rodriguez *et al.*, 2002; Ladero *et al.*, 2011). Infatti, com'è stato dimostrato nel grafico riportato, sebbene la pastorizzazione riduca il contenuto di ammine biogene a livello dei formaggi poiché riduce la carica microbica dei ceppi produttori di ammine biogene, è necessario affermare anche che il trattamento del latte crudo ad elevate temperature compromette la sua qualità organolettica e nutrizionale, rendendo il processo poco utilizzabile a livello dell'industria lattiero casearia. Inoltre, in molti casi, le regole dettate dai disciplinari di produzione di molti prodotti a Denominazione di Origine oppure a Indicazione Geografica non permettono l'utilizzo di tale tecnologia.

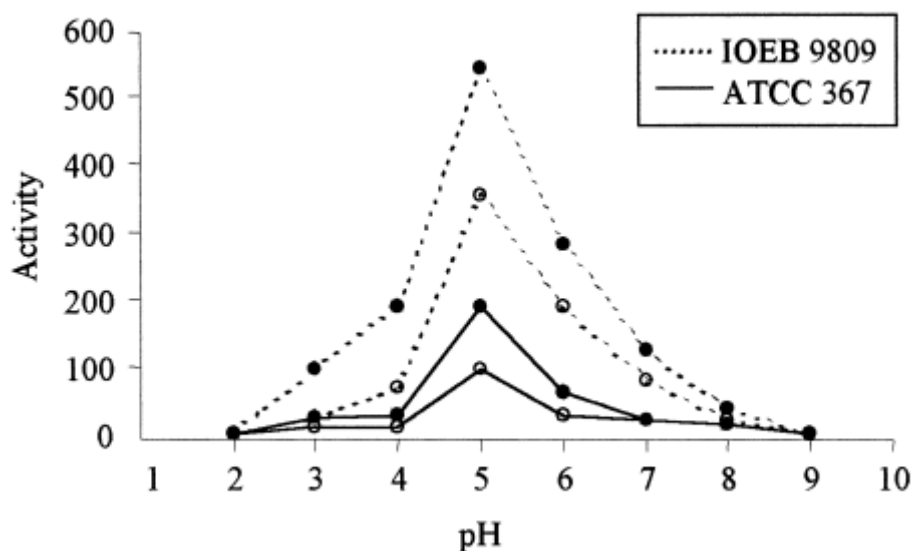


**Figura 2.1** Numero di cellule sopravvissute (log cfu mL<sup>-1</sup>) dopo la pastorizzazione a differenti temperature. I ceppi presi in considerazione sono *Lactobacillus curvatus* VI6 (grigio) e *Enterococcus durans* IPLA655 (bianco). La concentrazione iniziale è indicata come "Co" (V. Ladero *et al.*, 2011).

#### 2.1.4 pH

La fermentazione è intimamente associata ad un pH relativamente basso, originato dalla conversione del lattosio in acido lattico. Sebbene il ruolo fisiologico della biosintesi delle ammine biogene differisca in base all'ammina biogena prodotta e al microrganismo produttore, è stato riscontrato che i microrganismi ricorrono alla produzione di queste sostanze al fine di neutralizzare il ridotto pH extracellulare, in modo tale da sopravvivere allo stress acido originato durante la fermentazione lattica (Meng e Bennett, 1992; Rhee *et al.*, 2002). Infatti, è nota una certa relazione tra la diminuzione del pH e l'aumento della produzione di ammine biogene nei batteri lattici, in quanto aumenta notevolmente l'attività di alcune amminoacido decarbossilasi (Chander *et al.*, 1988; Teodorovic *et al.*, 1994), soprattutto per quanto riguarda la tirosina decarbossilasi (Moreno-Arribas e Lonvaud-Funel, 1999). Nello specifico, l'influenza del pH nella decarbossilazione della tirosina è stata stu-

diata all'interno di un range di pH da 2.0 a 9.0, riscontrando una certa attività della decarbossilasi nell'intervallo 3.0-7.0 con un optimum prossimo a 5.0 (figura 2.2).



**Figura 2.2** – Effetto del pH sull'attività della tirosina decarbossilasi di ceppi di *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 e *L. brevis* ATCC 367, rispettivamente in coltura pura (●) e in coltura mista (○). In ordinata l'unità di misura è espressa in  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  di proteina (Moreno-Arribas e Lonvaud-Funel, 1999).

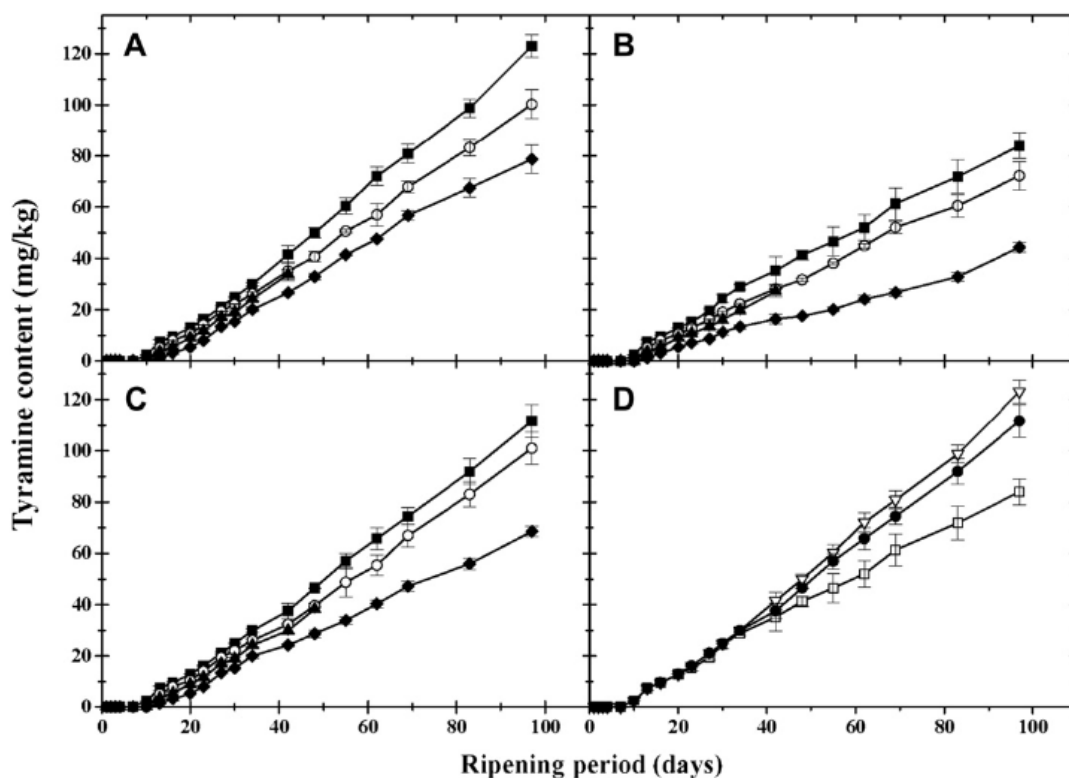
Tuttavia, sebbene alcuni autori affermino che una rapida acidificazione potrebbe ridurre il livello di produzione di ammine biogene come conseguenza dell'inibizione dei microrganismi decarbossilasi positivi (Gardini *et al.*, 2001), il pH ridotto è un parametro chiave per il rischio di accumulo di ammine biogene nel prodotto finito.

Ad ogni modo, è molto difficile agire a livello di questo parametro proprio poiché è strettamente legato al processo di fermentazione.

### 2.1.5 Temperatura

La temperatura è un parametro chiave nella produzione dei formaggi e ciò influisce notevolmente sull'accumulo di ammine biogene, soprattutto durante il periodo di maturazione e di stoccaggio. In generale, la produzione e l'accumulo di ammine biogene incrementa man mano che aumenta la temperatura durante il processo di produzione e soprattutto di stoccaggio. Nello specifico, lo stoccaggio del prodotto è inteso come il periodo che intercorre tra l'ultimo step della produzione, ovvero la maturazione, e il consumo. È stato dimostrato che temperature più basse di maturazione e di stoccaggio diminuiscono l'accumulo di ammine biogene come istamina, tiramina, putrescina e cadaverina (Bunková *et al.*, 2010) (figura 2.3).





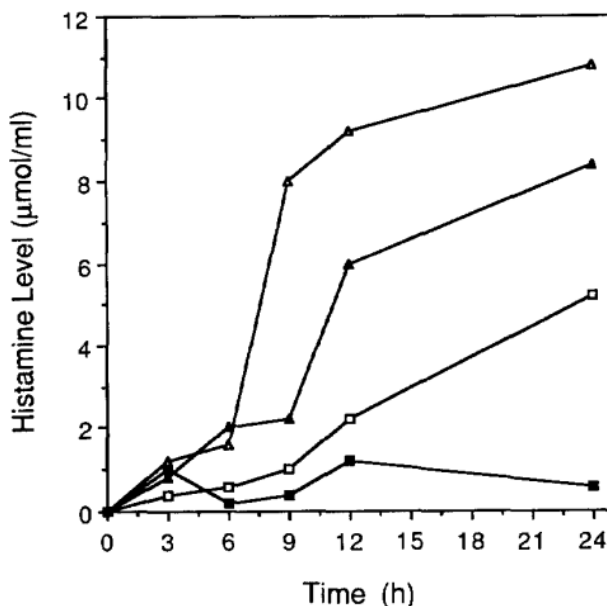
**Figura 2.3** – Andamento del contenuto di tiramina (mg/kg) nel formaggio Edam durante il periodo di maturazione e conservazione (giorni): A-stoccaggio in cella a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  per l'intero periodo; B-dopo tre settimane di stoccaggio in cella, le forme vengono inserite in frigo e conservate a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ; C-dopo cinque settimane in cella, le forme vengono inserite in frigo e conservate a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . ■ - primo strato; ○ - secondo strato; ▲ - terzo strato; ◆ - quarto strato. D – contenuto totale di tiramina nel primo strato nei tre metodi di conservazione: ▽ - intera conservazione in cella a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ ; - dopo tre settimane di conservazione in cella inserimento in frigo e conservazione a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ; • - dopo cinque settimane in cella inserimento in frigo e conservazione a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Il contenuto di tiramina è espresso come media ( $n = 24$ ) (Bunková *et al.*, 2010).

### 2.1.6 Cloruro di sodio

Il cloruro di sodio è una sostanza che viene normalmente utilizzata anche per il controllo della crescita dei microrganismi patogeni e deterioranti durante la fermentazione e la maturazione. Di conseguenza, questo effetto inibente si nota anche nei confronti dei microrganismi produttori di ammine biogene, il che si traduce in un minore impatto di queste sostanze a livello del prodotto finito. Una concentrazione di sale prossima al 5% è in grado di far diminuire l'accumulo di ammine biogene grazie all'attività inibitoria nei confronti dei microrganismi produttori, come *Enterococcus* spp. Infatti, in formaggi prodotti con *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus buchneri* si è osservata una riduzione dell'accumulo di ammine biogene come feniletilamina e tiramina a causa dell'attività inibitoria del sale nei confronti della crescita batterica e dell'attività decarbossilasica (Sumner *et al.*, 1990). Nel grafico riportato nella figura 2.4 è dimostrato l'effetto della concentrazione di cloruro di sodio sull'attività decarbossilasica di *Lactobacillus buchneri* per produrre istamina: si nota che in corrispondenza di una concentrazione di sale pari al 5,5%

quest'attività è notevolmente ridotta quando la coltura viene fatta crescere in terreno colturale MRS (*Man Rogosa Sharpe broth*).

Tuttavia, nella maggior parte dei casi, i formaggi presentano un contenuto di sale non più elevato del 3% e tale concentrazione non è certamente in grado di ridurre la capacità di *L. buchneri* di produrre istamina.



**Figura 2.4** – Effetto della concentrazione di cloruro di sodio nei confronti della capacità di *Lactobacillus buchneri* di produrre istamina in brodo colturale MRS (*Man Rogosa Sharpe broth*). Le concentrazioni di cloruro di sodio utilizzate sono:  $\Delta$  - 5%;  $\blacktriangle$  - 1,5%;  $\square$  - 3,5%;  $\blacksquare$  - 5,5% (Sumner et al., 1990).

### 2.1.7 Processi post-maturazione

Le moderne esigenze dei consumatori spingono il mercato ad offrire prodotti pronti al consumo anche per quanto riguarda il settore lattiero caseario. Di conseguenza, l'ulteriore manipolazione dei prodotti può portare ad un aumento del rischio di contaminazione da parte di microrganismi potenzialmente in grado di produrre ammine biogene (Reij e Dan Aantrekker, 2004). Ad esempio, è stato dimostrato che il processo di grattugia del formaggio ha portato ad un sensibile aumento del contenuto di istamina e di microrganismi produttori di tale sostanza in formaggi in cui precedentemente tale sostanza era presente in bassissima quantità. Nello specifico, la grattugia sembra abbia facilitato la contaminazione microbiologica a causa dell'aumento del rapporto superficie/volume.

## **2.2 Ammine biogene nei formaggi**

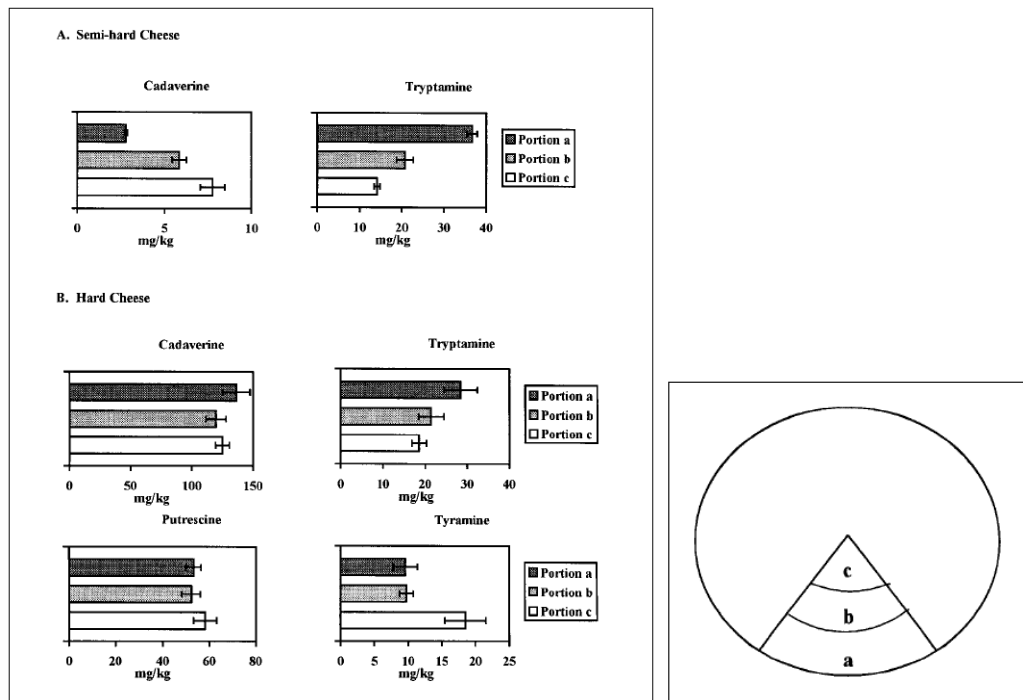
Come anticipato, le varie tecnologie di caseificazione utilizzate sono in grado di influire drasticamente sull'accumulo di ammine biogene a livello dei formaggi. Per tale motivo, è estremamente importante capire quali siano le principali ammine biogene contenute all'interno di determinate tipologie di formaggi e come queste ultime si distribuiscono all'interno della forma stessa.

### **2.2.1 Distribuzione delle ammine biogene all'interno della forma di formaggio**

Novella-Rodríguez *et al.* (2003) hanno dimostrato che ammine differenti vengono riscontrate a seconda del tipo di formaggio preso in considerazione (fresco, stagionato, duro e semiduro). Nello studio condotto, a livello dei formaggi freschi è stata riscontrata solamente la presenza di spermina a livelli relativamente ridotti (inferiori a 1,5 mg/kg) e senza differenze significative tra le aree interne ed esterne della forma. Nei formaggi semiduri e stagionati sono state invece riscontrate cadaverina, triptamina, spermidina e spermina. Tra le diverse parti della forma, però, non sono state osservate differenze per quanto riguarda le poliammine come la spermina e la spermidina; infatti, dal momento che queste ammine non sono sintetizzate dai microrganismi, la loro concentrazione più elevata nei formaggi semiduri è spiegata dall'effetto di concentrazione che avviene nella trasformazione del latte in formaggio. Inoltre, il fatto che non vi siano differenze tra le diverse parti della forma prese in considerazione rinforza ulteriormente l'origine non microbica di spermina e spermidina. Al contrario, cadaverina e triptamina dimostrano un gradiente differente tra le varie parti della forma di formaggio: il contenuto di cadaverina è generalmente inferiore nella porzione più esterna del formaggio, mentre il contenuto di triptamina è maggiore in questa porzione.

Nel caso dei formaggi maggiormente stagionati ottenuti per lo più da latte crudo è stato osservato un quantitativo molto più elevato di ammine biogene. Così come si è osservato nel caso dei formaggi semiduri, non sono state riscontrate differenze nella distribuzione di spermina e spermidina tra le varie porzioni della forma di formaggio. Inoltre, in aggiunta alla cadaverina e alla triptamina, in questi formaggi sono state rilevate tiramina e putrescina. Un certo gradiente di concentrazione è stato osservato per triptamina e tiramina; tuttavia, mentre il contenuto di triptamina cresce dall'interno verso l'esterno, per quanto riguarda la tiramina il contenuto è minore nella parte più esterna della forma. Per quanto riguarda la putrescina e la cadaverina non sono invece state riscontrate particolari differenze tra le parti più esterne e più interne della forma. Tuttavia, mentre il gradiente di triptamina è risultato simile nei formaggi semiduri e in quelli duri più stagionati, per quanto riguarda la cadaverina non si può affermare lo stesso, in quanto nel caso di questi ultimi prodotti non è stata riscontrata differenza tra le diverse porzioni di forma di formaggio.

Il gradiente di concentrazione osservato per alcune ammine biogene può essere spiegato dalle differenze che si verificano a livello di microambiente all'interno delle varie forme di formaggio, in particolare quando le forme sono di dimensioni particolarmente elevate. Infatti, queste differenti condizioni possono modulare la crescita o l'attività di particolari microrganismi con differenti capacità di produzione di ammine biogene. Ad esempio, i microrganismi produttori di triptamina prediligono condizioni di tipo aerobico, mentre quelli produttori di tiramina si sviluppano meglio in condizioni anaerobiche, come quelle che si riscontrano nelle porzioni più interne del formaggio.



**Figura 2.5** – Distribuzione delle ammine biogene (mg/kg) in forme di formaggio ottenute da latte di capra intero, a partire dall'esterno della forma (portion a) fino all'interno (portion c) (Novella-Rodríguez *et al.*, 2003).

### 2.2.2 Distribuzione delle ammine biogene in differenti tipi di formaggio e prodotti lattiero caseari

Il contenuto di ammine biogene riscontrabile nei prodotti lattiero caseari è strettamente legato al processo di produzione e può variare da pochi milligrammi a decine di milligrammi per chilogrammo di prodotto. A livello di prodotti come yogurt e kefir l'ammina biogena principalmente presente è la tiramina, con valori che possono arrivare fino a 6 mg/kg (Pekcici *et al.*, 2021). Tuttavia, anche la putrescina, l'istamina e la spermina sono state riscontrate nello yogurt, mentre la cadaverina, la fenilettilammina e la spermidina sono state riscontrate nel kefir. Tuttavia, dato il breve processo di produzione e la ridotta *shelf-life* di questi prodotti, la presenza di queste ammine biogene è principalmente correlabile alle scorrette pratiche igieniche durante la trasformazione.

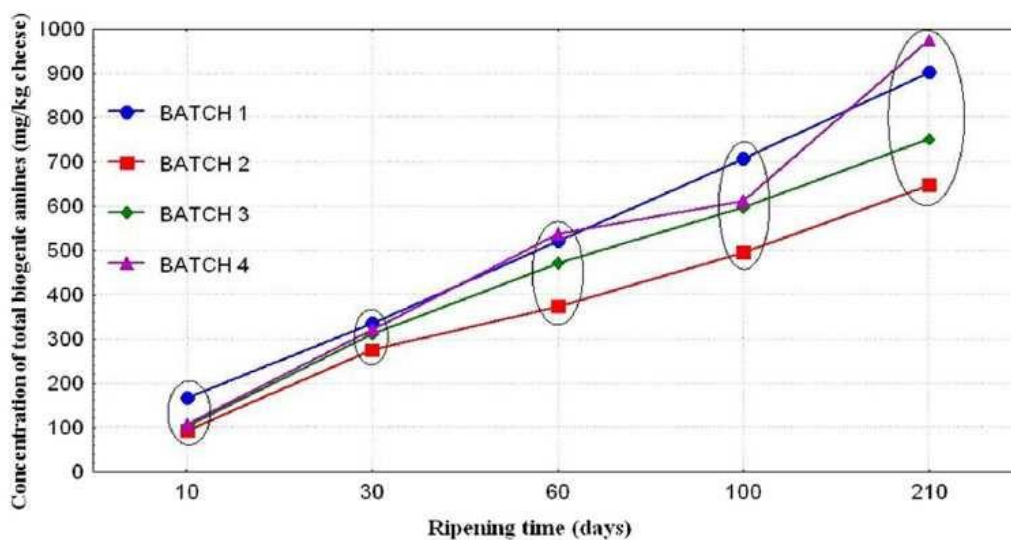
La concentrazione media delle varie ammine biogene in vari formaggi e prodotti lattiero caseari è riportata nella tabella 2.2. I valori maggiori si riscontrano generalmente in formaggi stagionati, i quali accumulano ammine biogene proprio durante la fase di maturazione; infatti, mentre il livello totale di ammine biogene nei formaggi freschi varia da 11,21 a 62,1 mg/kg, può passare da 257,7 a 384,3 mg/kg nel caso dei formaggi stagionati (Kandasamy *et al.*, 2021).

Ulteriori analisi sono state effettuate in corrispondenza di formaggi molli, semiduri e duri, riscontrando il più elevato contenuto medio di ammine biogene totali in corrispondenza dei campioni prelevati dal centro dei formaggi semiduri (354 mg/kg), seguiti dai formaggi molli e duri (rispettivamente 249 e 157 mg/kg). L'ammina biogena principalmente riscontrata è la tiramina, che costituisce percentuali anche molto elevate (fino al 75%) sul totale delle ammine biogene presenti, con un contenuto medio prossimo ai 200 mg/kg. L'istamina è la seconda ammina biogena principalmente presente, principalmente a livello dei formaggi semiduri (87,8 mg/kg) e duri (28,4 mg/kg) (Zdolec *et al.*, 2022).

Gli studi indicano inoltre un importante accumulo di ammine biogene a livello dei formaggi erborinati, soprattutto se stagionati, a causa della presenza di differenti specie fungine che possono portare a modificazioni di carattere biochimico a livello delle proteine del latte durante la fermentazione e la stagionatura (Reinholds *et al.*, 2020). È stato riscontrato che i valori di tiramina in questi formaggi possono variare da circa 453 a 2130 mg/kg, mentre l'istamina può variare da 153 a 1850 mg/kg.

È stato osservato anche che alcuni formaggi di pecora ottenuti grazie a colture starter commerciali presentavano una concentrazione maggiore di cadaverina, spermidina, istamina e triptamina rispetto agli stessi formaggi ottenuti però attraverso la fermentazione condotta dalle colture autoctone. Questo risultato può essere ricondotto al fatto che le colture starter commerciali vengono selezionate anche per la loro elevata capacità proteolitica, con l'obiettivo di accelerare il periodo di maturazione; al contrario, i ceppi autoctoni sono caratterizzati da una più blanda attività proteolitica e decarbossilasica (Renes *et al.*, 2014). Nel grafico riportato nella figura 2.6 è rappresentato l'andamento del contenuto totale di ammine biogene durante la maturazione di quattro gruppi di formaggi ottenuti sia con colture starter commerciali che con colture autoctone: è interessante notare come, dopo circa 100 giorni di maturazione, i formaggi con un contenuto di ammine biogene totale maggiore siano proprio quelli ottenuti grazie a colture starter commerciali (*BATCH 1*).

Il consumatore moderno preferisce formaggi ottenuti con tecniche artigianali e tradizionali, che sono in grado di conferire al prodotto caratteristiche organolettiche pressoché uniche e legate al singolo formaggio. Un esempio è l'utilizzo di latte crudo anziché pastorizzato, il che porta ad accumulare un quantitativo generalmente più elevato di ammine biogene.



**Figura 2.6** – Evoluzione del contenuto di ammine biogene totali (mg/kg) in differenti gruppi di formaggi di pecora durante la conservazione. BATCH 1: coltura commerciale CHOOZIT™ LYO MA 011 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*); BATCH 2: coltura autoctona con *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*; BATCH 3: coltura autoctona con *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* e *Lactobacillus plantarum*; BATCH 4: coltura autoctona con *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ed *Enterococcus raffinosus* (Renes et al., 2014).

**Tabella 2.2** – Contenuto di ammine biogene in alcune tipologie di formaggi (Schirone et al., 2022).

Cheese type	Biogenic amine (mg kg <sup>-1</sup> )					Reference
	PUT	CAD	HIS	TYR	Total	
Herby	nd–847.0	nd – 1844.5	nd–681.5	18–1125.5	99.5–4723.0	Andiç, Genççelep, and Kose (2010)
Pecorino Carmasiano	100.0	120.0	65.5	136.4		Mercogliano, De Felice, Chirollo, and Cortesi (2010)
Blue						Linares, Martin, Ladero, Alvarez, and Fernandez (2011)
Raw milk	0–875.8	0–756.8	0–1041.8	0–1052.0		
Pasteurised milk	0–237.6	40.0–89.4	0–127.0	0–526.6		
Pecorino di Farindola	9.9–394.1	26.8–276.1	0–21.8	52.3–1171.3		Schirone, Tofalo, Mazzone, Corsetti, and Suzzi (2011)
Blue	–	–	113.4	2269.3	2382.7	Vallejos, Pham, and Barraquio (2012)
Cheddar	–	–	217.9	571.3	789.2	
Edam	–	–	49.9	199.7	249.6	
Blue-veined	17.3–33.5	–	–	7.2–52.2		Calzada et al. (2013)
Koopenh	2.3–2982.6	2.3–4697.8	2.3–1102.2	2.9–2596.9	517.7	Razavi Rohani, Aliakbarlu, Ehsani, and Hassanzadazar (2013)
Lighvan	40.9–758.2	20.9–1280.9	4.5–73.1	137.2–656.5	1009.0	
Red salmas	72.3–843.7	386.5–1075.8	11.6–254.0	10.1–423.6	1426.9	
Egyptian						El-Zahar, El Zaher, and Ramadan (2014)
Mish	100.3–191.0	100.5–201.0	140.6–291.3	120.4–150.4	572.1–1154.3	
RAS	60.2–130.5	nd–130.7	120.5–231.1	30.1–50.3	342.2–782.9	
Blue	10.1–90.3	40.1–110.3	40.1–140.7	nd–80.2	212.1–703.3	
Apulian or Sicilian	nd–594.0	nd–199.0	nd–435.0	4.0–305.0	3.2–12279.0	Guarcello et al. (2015)
Pecorino Sardo	0.1–0.8	0.1–9.7	nd–7.2	nd–19.3		Manca et al. (2015)
Pecorino	nd–92.7	nd–137.0	nd–128.4	1.6–93.0		
Casu Marzu	1.9–165.8	3.1–470.7	nd–126.0	nd–231.4		
Pecorino Toscano	22.0–512.0	2.0–262.0	nd–23.0	147.0–1132.0		Torracca, Nuvokni, Ducci, Bacci, and Pedonese (2015)
Irish Artisanal A	122.0	5.0	22.9	140.4	290.3	O'Sullivan et al. (2015)
Reblochon	28.2	22.3	8.4	45.1	104.1	
Irish Artisanal B	157.2	74.4	34.4	190.6	456.6	
Manchego	nd	4.0	nd	17.9	21.9	
Morbier	212.7	267.4	85.1	171.3	736.5	
Tête de Moine	nd	35.7	51.6	44.6	131.9	
Pecorino Sardo	66.9	3.5	23.4	40.4	134.2	
Ossau-Iraty	40.1	9.4	20.8	323.4	393.8	
Comté	nd	9.3	nd	4.5	13.8	
Gorgonzola	3.9	1.2	29.2	nd	34.2	
Zamorano	10.0–190.0	5.0–35.0	1.0–55.0	1.0–85.0		Combarros-Fuertes et al. (2016)
Goat	0.8–21.7	0.5–74.8	10.2–60.5	4.2–50.7	26.4–175.1	Poveda, Molina, and Gómez-Alonso (2016)
Cheddar	2.7	1.6	5.8	5.8	21.1	Bonczar, Filipczak-Fiutak, Pluta-Kubica, Walczycka, and Staruch (2018)
Emmentaler	67.0	4.3	2.5	67.6	153.0	
Camembert	6.5	2.4	1.1	6.2	20.8	
Tvorog	6.2	7.4	3.0	7.5	28.4	
Harzer	281.3	377.5	24.1	275.5	1010.4	
Fried	3.11	4.2	1.1	6.9	23.4	
Kashar						Sahin Ercan, Soysal, and Bozkurt (2019)
Fresh	12.5–274.6	9.2–120.6	29.0–106.8	37.7–125.2		
Mature	50.1–440.2	95.5–448.2	52.8–2035.8	71.2–6665.6		
Fiore Sardo	<0.2–730.0	1.0–9.4	<0.7–250.0	0.5–800.0		Zazzu et al. (2019)
Raw milk	0.3–2.5	1.3–3.8	nd–9.5	0.7–5.8	9.3	Pluta-Kubica, Filipczak-Fiutak, Domagata, Duda, and Migdal (2020)
Pasteurised milk	0.2–1.8	1.0–2.8	2.2–2.6	0.8–3.9	8.7	
Mould-ripened blue	1.3–45.5	1.7–131.0	0.2–186.0	1.1–717.0		Reinholds et al. (2020)
Halloumi						Kandasamy et al. (2021)
Goat	nd	nd	nd	nd	15.2–15.7	
Cow	nd	nd	nd	nd	11.2–19	
String	nd–3.5	nd	nd–13.5	nd	43.0–62.1	
Quark	nd	nd	nd	nd	15.1	
Cottage	nd	nd	nd	nd	26.8	
Hard Cheddar	nd	nd	nd	82.6–16.2	257.7	
Semi-hard Gouda	nd	17.7–92.5	9.7–111.2	59.3–70.8	292.8–384.3	
Mould-ripened	0.6–30.5	0.6–5.4	0.7–14.0	1.0–710.5	2.9–760.4	
Semi-hard	0.8–95.2	<0.6–436.7	4.2–248.6	<0.9–767.0	6.5–1547.5	
Hard	<0.6–11.6	<0.6–119.4	<0.6–116.4	<0.9–263.3	2.7–483.7	Zdolec et al. (2022)

<sup>a</sup> Abbreviations are: CAD, cadaverine; HIS, histamine; PUT, putrescine; TYR, tyramine; nd, not detected.

### 3 Metodi di analisi delle ammine biogene

Tra i metodi analitici di determinazione delle ammine biogene spiccano le tecniche cromatografiche, in particolare l'*High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), che viene condotta a seguito di un'apposita derivatizzazione delle molecole stesse. Questo metodo è il più utilizzato e comune per la determinazione delle ammine biogene negli alimenti; infatti, il metodo di riferimento specificato nel Regolamento CE n.2073/2005 riguarda la determinazione dell'istamina nel pesce e nei prodotti a base di pesce ed è basato proprio sul metodo HPLC associato ad una derivatizzazione con cloruro di dansile. Nel caso di campioni di formaggio, per la determinazione delle ammine biogene vengono spesso utilizzate colonne ultra-HPLC con derivatizzazione delle molecole con dietil etossimetilenemalonato; questa tecnica, nello specifico, permette di quantificare simultaneamente ammine biogene, amminoacidi e ioni ammonio in campioni di formaggi in un tempo inferiore ai 10 minuti (Redruello *et al.*, 2013).

Recentemente, è stato messo a punto un metodo di analisi delle ammine biogene a livello dei prodotti lattiero caseari che si avvale della tecnologia dell'elettroforesi capillare; attraverso questa procedura è possibile determinare quantitativamente le ammine biogene maggiormente riscontrabili a livello dei prodotti lattiero caseari. Il principale vantaggio di questa tecnologia è che non è richiesto alcun passaggio di pre-concentrazione e derivatizzazione del campione, a differenza dei metodi convenzionali sopracitati. La tecnologia è stata applicata con successo anche a campioni di latte fermentato, come lo yogurt e il kefir (Adimcilar *et al.*, 2017).

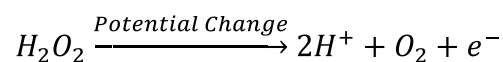
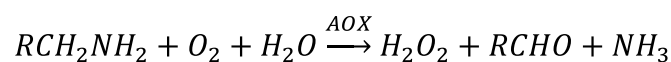
Per quanto riguarda la determinazione di specifici ceppi decarbossilasi-positivi, invece, si ricorre a specifici protocolli PCR basati su geni codificanti per gli enzimi decarbossilasi (Coton & Coton, 2005). Nel caso del settore lattiero caseario, nello specifico, è stata sviluppata una *real time PCR* per la determinazione e la quantificazione di batteri produttori di istamina, tiramina e putrescina; questa tecnica è stata utilizzata con successo in corrispondenza di differenti stadi del processo di produzione del formaggio, incluso il prodotto finito.

Le tecniche tradizionali di determinazione delle ammine biogene nelle varie matrici alimentari presentano tuttavia numerosi svantaggi, come la ridotta specificità, il costo delle strumentazioni e la lunghezza dei tempi di risposta. Nuovi approcci mirano all'utilizzo di moderni biosensori, soprattutto grazie alla loro maggiore sensibilità, economicità e immediata risposta (Verma *et al.*, 2020). Queste tipologie di sensori fanno uso di anticorpi, microrganismi, recettori a livello di membrana, tessuti ed enzimi, utilizzati come elementi di riconoscimento di tipo biologico. Nello specifico, gli enzimi sono quelli più utilizzati nella produzione di biosensori grazie alla loro elevata disponibilità



e reperibilità a livello del mercato. Grazie agli enzimi applicati a livello dei biosensori, l'interazione dell'enzima stesso con l'ammina biogena dà origine ad una specifica risposta, che può riguardare la produzione di un composto oppure il consumo di una determinata sostanza (Kurbanoglu, Erkmen, & Uslu, 2020; Scheller *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2020). Inoltre, sono stati messi a punto diversi sensori basati su nanoenzimi che si avvalgono delle tecnologie di chemiluminescenza, fluorescenza e colorimetria.

Essenzialmente, un biosensore si basa sui cambiamenti fisico-chimici che si verificano a seguito di un'interazione di tipo biologico tra l'enzima e una sostanza presente nel campione oggetto di analisi. Questa reazione dà origine ad un segnale, il quale viene processato, amplificato e convertito in un segnale digitale che può essere letto e interpretato, convertendolo così in una misura quantitativa della concentrazione della sostanza da ricercare. I biosensori enzimatici sono in grado di unire la selettività dell'enzima nel riconoscimento delle ammine biogene con una sensibile, veloce e precisa rilevazione grazie alla trasduzione diretta della reazione in un segnale facilmente osservabile. Le ammine biogene sono un particolare tipo di ammine e, per tale motivo, gli enzimi utilizzati nei biosensori sono le ammino-ossidasi (AOX); nello specifico, questi enzimi sono in grado di produrre perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ammoniaca in presenza di un accettore di elettroni, come l'ossigeno molecolare, durante la deaminazione delle ammine in aldeidi (Lange e Wittmann, 2002; Singh *et al.*, 2020; Verma *et al.*, 2020). L'elettrone rilasciato dall'ossidazione del perossido di idrogeno è impiegato per la valutazione della variazione di potenziale elettrico, il quale è viene misurato da un biosensore potenziometrico allo scopo di rivelare il contenuto di ammina biogena (Pundir, Deswal e Narwal, 2018).



## 4 Misure di prevenzione e controllo

Data l'effettiva e dimostrata tossicità delle ammine biogene, è necessario ridurre la anche la contaminazione dei prodotti lattiero caseari ad un livello minimo. A tal scopo sono state proposte differenti strategie, che vanno dal mantenimento delle corrette prassi igieniche all'inibizione dei microrganismi produttori di ammine biogene, dalla riduzione del contenuto di substrato amminoacidico a disposizione dei batteri alla riduzione del tempo di maturazione. Tuttavia, in alcuni casi, le caratteristiche dei prodotti stessi rendono inapplicabili le strategie preventive, mentre in altri casi sono troppo onerose da applicare. Processi innovativi di prevenzione e di riduzione del contenuto di ammine biogene negli alimenti riguardano le elevate pressioni idrostatiche, le radiazioni, le atmosfere controllate e l'utilizzo di colture starter o di particolari additivi alimentari in grado di degradare le ammine biogene (Naila *et al.*, 2010).

### 4.1 Radiazioni

Le radiazioni sono un mezzo promettente anche per la rimozione di ammine biogene dai prodotti lattiero-caseari, in quanto possono agire sia sui microrganismi che le producono che sulle AB preformate già presenti nell'alimento.

Le radiazioni ionizzanti ( $x$  e  $\gamma$ ) sono legalmente approvate per la conservazione dei cibi in circa 50 paesi in tutto il mondo, anche se il numero è in continua crescita grazie alle nuove evidenze scientifiche che dimostrano come i benefici di tali tecniche siano notevolmente superiori agli effettivi rischi. Tuttavia, per quanto riguarda gli alimenti fermentati (tra cui i prodotti lattiero caseari) non ne è ancora stato legiferato l'utilizzo, anche se molti studi dimostrano l'efficacia di questa tecnologia nella riduzione del contenuto di ammine biogene. L'esposizione di varie tipologie di formaggi ad una radiazione  $\gamma$  con un'intensità variabile da 1 a 6 kGy ha dimostrato un'efficacia nella riduzione dei microrganismi produttori di ammine biogene e nella riduzione delle sostanze stesse (Aly *et al.*, 2012; Shalaby *et al.*, 2016) (tabella 4.1).

Nello studio condotto da Shalaby *et al.* (2016) la qualità organolettica dei formaggi sottoposti a irraggiamento è stata valutata grazie ad un'analisi di tipo sensoriale; in linea generale, è stato riscontrato che non si verificano grandi variazioni dal punto di vista organolettico durante la maturazione nei formaggi sottoposti a radiazioni, come invece accade nel caso dei formaggi non trattati. In altre parole, mentre nei formaggi non trattati il sapore, la consistenza e l'odore tendono ad evolvere nel corso della maturazione per effetto della flora microbica, nel caso dei formaggi irradiati si riscontrano caratteri organolettici molto simili sia all'inizio che alla fine della maturazione. Ciò si traduce in una potenziale maggiore *shelf-life* dei prodotti trattati rispetto a quelli non trattati. Inoltre, dalla

nella 4.1 riportata è possibile osservare che l'istamina è più sensibile alle radiazioni gamma in quanto è completamente degradata grazie a radiazioni con un'intensità pari a 10 kGy, mentre la tiramina viene completamente degradata a 15 kGy.

**Tabella 4.1** – Contenuto di ammine biogene (mg/kg) all'interno di formaggio Rumi sottoposto a differenti dosi di radiazione (kGy) e conservato per diversi periodi di tempo. Ciascun campione di formaggio (50 g) è stato irradiato separatamente fino a raggiungere la rispettiva dose di radiazione esattamente al centro del campione. (Shalaby *et al.*, 2016).

Analytes	Storage periods	Irradiation dose (kGy)			
		0	5	10	15
Cadaverine	0	55.2 ± 1.3 <sup>D</sup>	12.8 ± 0.5 <sup>E</sup>	4.9 ± 0.4 <sup>F</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>G</sup>
	2	57.3 ± 1.7 <sup>C</sup>	13.2 ± 0.5 <sup>E</sup>	5.3 ± 0.5 <sup>F</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>G</sup>
	4	61.3 ± 2.5 <sup>B</sup>	13.5 ± 0.7 <sup>E</sup>	5.4 ± 0.5 <sup>F</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>G</sup>
	6	67.3 ± 2.2 <sup>A</sup>	14.1 ± 0.3 <sup>E</sup>	5.9 ± 0.3 <sup>F</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>G</sup>
Histamine	0	7.1 ± 0.5 <sup>D</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>G</sup>	nd <sup>H</sup>	nd <sup>H</sup>
	2	7.8 ± 0.5 <sup>C</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>F</sup>	nd <sup>H</sup>	nd <sup>H</sup>
	4	8.7 ± 0.5 <sup>B</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>F</sup>	nd <sup>H</sup>	nd <sup>H</sup>
	6	9.6 ± 0.7 <sup>A</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>E</sup>	nd <sup>H</sup>	nd <sup>H</sup>
Putrescine	0	32.5 ± 0.8 <sup>D</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>G</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>I</sup>	nd <sup>J</sup>
	2	34.3 ± 0.8 <sup>C</sup>	3.7 ± 0.9 <sup>FG</sup>	1.4 ± 0.2 <sup>I</sup>	nd <sup>J</sup>
	4	37.4 ± 0.7 <sup>B</sup>	4.2 ± 0.4 <sup>EF</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>HI</sup>	nd <sup>J</sup>
	6	40.8 ± 1.3 <sup>A</sup>	4.4 ± 0.4 <sup>E</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>H</sup>	nd <sup>J</sup>
Tyramine	0	790.8 ± 8.1 <sup>D</sup>	20.6 ± 0.5 <sup>E</sup>	9.1 ± 0.2 <sup>F</sup>	3.2 ± 0.1 <sup>G</sup>
	2	810.3 ± 7.7 <sup>C</sup>	21.3 ± 0.5 <sup>E</sup>	9.2 ± 0.2 <sup>F</sup>	3.3 ± 0.2 <sup>G</sup>
	4	860.6 ± 8.5 <sup>B</sup>	21.5 ± 0.7 <sup>E</sup>	9.3 ± 0.3 <sup>F</sup>	3.4 ± 0.2 <sup>G</sup>
	6	930.8 ± 8.6 <sup>A</sup>	21.8 ± 0.7 <sup>E</sup>	9.7 ± 0.3 <sup>F</sup>	3.7 ± 0.2 <sup>G</sup>
Total biogenic amines	0	885.6 ± 10.7	37.2 ± 1.3	15.3 ± 0.8	3.4 ± 0.1
	2	909.7 ± 10.7	39.5 ± 1.9	15.9 ± 0.9	3.5 ± 0.2
	4	968.0 ± 12.2	40.0 ± 1.9	16.4 ± 1.0	3.6 ± 0.2
	6	1048.5 ± 12.8	41.2 ± 1.5	17.8 ± 0.5	4.0 ± 0.2

Mean with the same letters is not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

Tuttavia, le radiazioni ionizzanti applicate con un'intensità superiore ai 6 kGy possono portare alla formazione di radicali liberi e all'ossidazione lipidica, con conseguente alterazione della composizione chimica degli alimenti (Chong *et al.*, 2011). Le radiazioni ionizzanti, inoltre, possono essere particolarmente utili in alcuni formaggi a seguito della maturazione al fine di ridurre il contenuto di ammine biogene e, allo stesso tempo, prevenire la sovraturazione, in quanto viene ridotta la carica microbica.

## 4.2 Utilizzo di ceppi starter selezionati

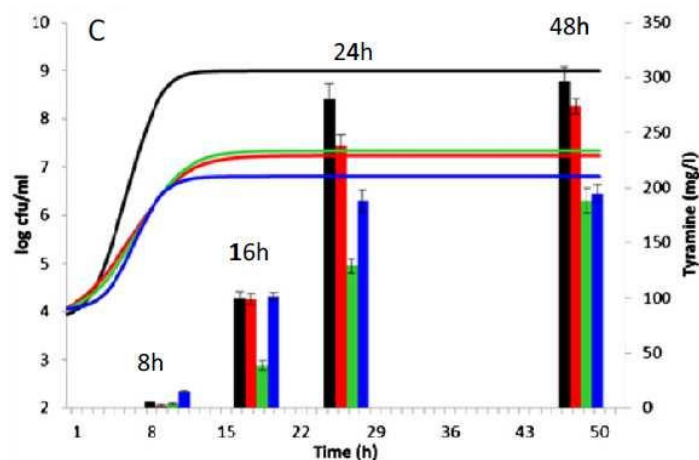
Alcuni ceppi di batteri lattici si sono dimostrati in grado di ridurre il contenuto di ammine biogene in vari alimenti, inclusi i prodotti lattiero caseari (Naila *et al.*, 2010). Dunque, la selezione deve orientarsi verso ceppi decarbossilasi-negativi oppure BA-ossidasi, ossia in grado di degradare le ammine biogene (Linares *et al.*, 2011).

Batteri lattici appartenenti al genere *Lactobacillus* ed *Enterococcus* caratterizzati da attività decarbossilasica sono i principali microrganismi coinvolti nell'accumulo di ammine biogene nei prodotti

lattiero caseari. Infatti, specie appartenenti ad entrambi questi generi sono molto presenti a livello del latte crudo e, inoltre, i lattobacilli sono parte di molti starter commerciali utilizzati nell'industria lattiero casearia. Dunque, oltre a partire da latte caratterizzato da una buona qualità microbiologica, l'utilizzo di colture starter costituite da più ceppi non produttori di ammine biogene aiuta notevolmente a ridurre l'accumulo di tali sostanze. In altre parole, è necessario ricorrere a colture starter decarbossilasi-negative in modo tale da ridurre il più possibile l'accumulo di ammine biogene a livello del prodotto finito. Tuttavia, è molto difficile selezionare uno starter universale in grado di contrastare l'accumulo di ammine biogene nei formaggi a causa dell'estrema variabilità della materia prima in termini di popolazione microbica iniziale, tipologia di aminoacidi liberi. Inoltre, è essenziale stabilire se i ceppi starter possiedono, a livello di corredo genetico, specifici geni associati alla produzione di ammine biogene come l'istamina o la tiramina (*hdc* – istidina decarbossilasi; *tdc* – tirosina decarbossilasi) (O'Sullivan *et al.*, 2015).

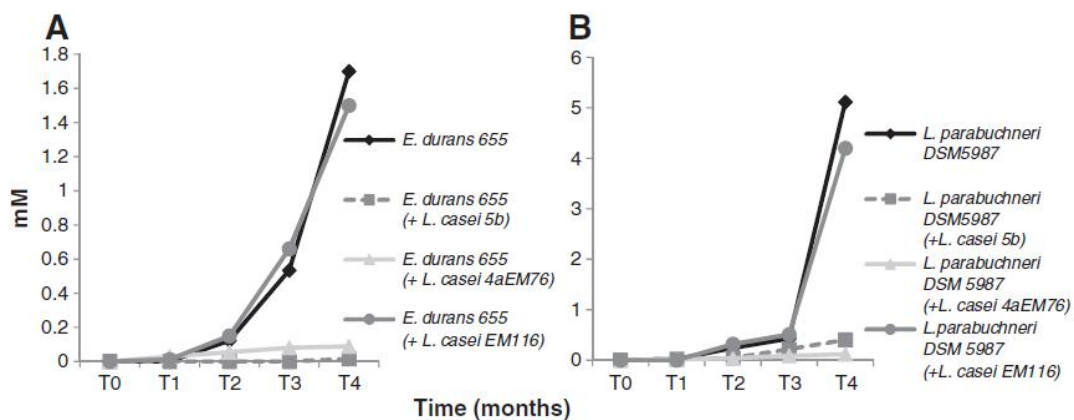
Inoltre, alcuni ceppi di *Lactococcus lactis* sono in grado di produrre batteriocine capaci di inibire la proliferazione di ceppi di *Streptococcus thermophilus* ed *Enterococcus faecalis* produttori di ammine biogene (Tabanelli *et al.*, 2014) (figura 4.1).

Tuttavia, come già accennato, le ammine biogene possono essere prodotte anche da organismi differenti rispetto ai batteri lattici starter, come le muffe oppure i lieviti utilizzati per i processi tecnologici, per la maturazione, o addirittura presenti a livello del latte. Di conseguenza, risulta necessario non solo trovare dei mezzi che prevengono la formazione delle ammine biogene, ma anche di mezzi in grado di rimuovere quelle preformate.



**Figura 4.1** – Curve di crescita di *Enterococcus faecalis* EF37 in presenza o meno di colture di *Lactococcus lactis* in grado di produrre batteriocine. Nella stessa figura sono riportate anche le concentrazioni di tiramina (mg/L) accumulate dopo 4, 8, 16, 24 e 48 ore. I ceppi produttori di batteriocine sono stati isolati a partire da latte crudo e la loro attività antibatterica è stata determinata in terreno colturale M17 a base di agar in condizioni aerobiche (Tabanelli *et al.*, 2014).

Una strategia emergente, a tal scopo, appare quella che prevede l'utilizzo di ceppi in grado di degradare le ammine biogene; attualmente, però, sono state effettuate solamente prove in vitro utilizzando ceppi batterici che potrebbero essere potenzialmente utilizzati anche nei prodotti lattiero caseari: *Micrococcus varians* (Leuschner e Hammes, 1998); *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus* (Dapkevicius *et al.*, 2000); *Staphylococcus xylosum* (Mah e Hwang, 2009); *Lactobacillus casei* e *Pediococcus* spp. (Garcia-Ruiz *et al.*, 2011). Ad esempio, alcuni ceppi di *Lactobacillus casei* isolati da formaggi come Zamorano, Cabrales ed Emmentaler sono in grado di degradare tiramina e istamina (prove in vitro), riducendone così il contenuto in modelli sperimentali (Herrero-Fresno *et al.*, 2012) (figura 4.2). È stato inoltre dimostrato che specie isolate a partire da substrati lattieri sono in grado di ridurre la concentrazione di istamina del 50% in modelli di laboratorio (Naila *et al.*, 2012).



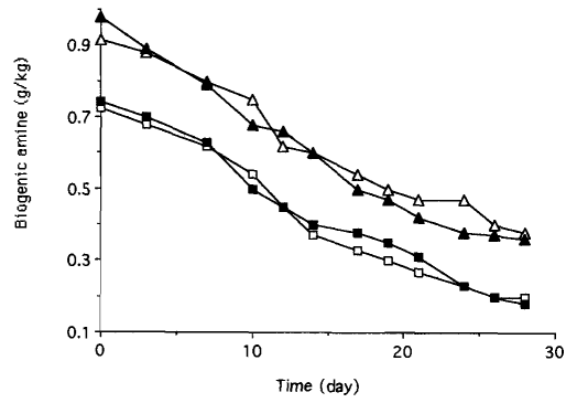
**Figura 4.2** – Analisi del contenuto totale di ammine biogene in formaggi Cabrales durante il periodo di maturazione. A) Monitoraggio della concentrazione di tiramina in Cabrales ottenuto con *Enterococcus durans* 655. B) Monitoraggio del contenuto di istamina in Cabrales ottenuto con *Lactobacillus parabuchneri* DSM 5987. In entrambi i casi, i ceppi di *Lactobacillus casei* aggiunti e in grado di degradare le ammine biogene sono contrassegnati tra parentesi (Herrero-Fresno *et al.*, 2012).

Infine, batteri afferenti alla specie *Brevibacterium linens* inoculati in superficie in formaggi come il Munster (formaggio DOP francese a pasta molle, grasso, a breve stagionatura) sono in grado di ridurre il contenuto di tiramina e istamina dal 55% al 70% durante un periodo di maturazione pari a 4 settimane (Leuschner e Hammes, 1998) (figura 4.3).

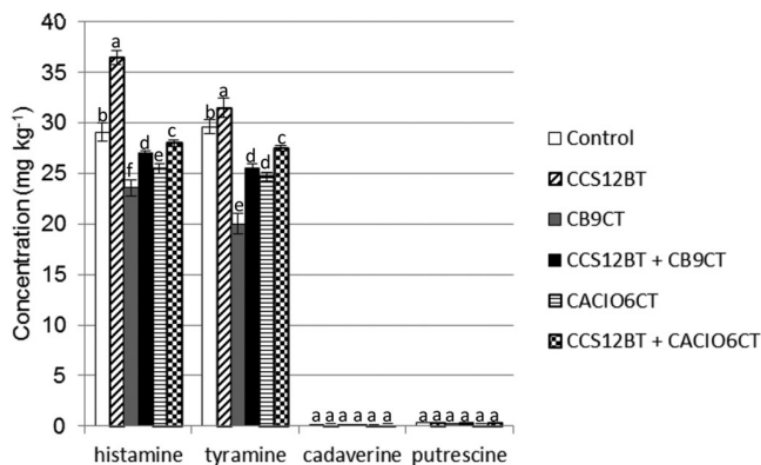
Uno studio condotto da Guarcello *et al.* (2016) ha inoltre testato con successo due ceppi di *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* come colture starter in grado di ridurre la concentrazione di istamina e tiramina in Caciocavallo proprio grazie alla loro attività degradativa (figura 4.4).

Tutte queste dimostrazioni permettono di confermare il grande potenziale dell'applicazione di ceppi non produttori di ammine biogene o di ceppi in grado di degradare tali sostanze; tuttavia, affinché i batteri siano attivi e la loro azione sia efficace, essi devono essere in grado di crescere in modo ot-

timale nella matrice e di prevalere sugli altri batteri in grado di produrre ammine biogene (Xu *et al.*, 2010). Inoltre, i batteri devono essere selezionati sulla base della loro capacità di crescere nello stesso ambiente in cui devono svolgere la loro funzione senza creare competizioni; pertanto, l'efficacia dev'essere confermata *in situ*.



**Figura 4.3** – Andamento della concentrazione di istamina e tiramina durante la maturazione del formaggio Münster inoculato con *Brevibacterium linens* LTH 3686: ▲ tiramina in superficie; △ tiramina al centro della forma; ■ istamina in superficie; □ istamina al centro della forma (Leuschner and Hammes, 1998).



**Figura 4.4** – Concentrazione di istamina, cadaverina, tiramina e putrescina in formaggio Caciocavallo stagionato per 60 giorni. Control, Caciocavallo inoculato con coltura starter di *Streptococcus thermophilus*; CCS12BT, Caciocavallo inoculato con *S. thermophilus* e *Lactobacillus fermentum* CCS12BT; CB9CT, Caciocavallo inoculato con *S. thermophilus* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CB9CT; CCS12BT + CB9CT, Caciocavallo inoculato con *S. thermophilus*, *Lb. fermentum* CCS12BT e *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* CB9CT; CACIO6CT, Caciocavallo inoculato con *S. thermophilus* e *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* CACIO6CT; CCS12BT + CACIO6CT, Caciocavallo inoculato con *S. thermophilus*, *Lb. fermentum* CCS12BT, e *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* CACIO6CT. Lettere differenti indicano significative differenze ( $P < 0.05$ ) nei valori medi (Guarcello *et al.*, 2016).

La tabella 4.2 riportata, pertanto, riassume gli studi riguardanti la degradazione delle ammine biogene da parte dei microrganismi presenti a livello dei vari prodotti alimentari.

In alcuni casi, però, gli studi hanno dimostrato che sebbene alcuni ceppi siano effettivamente in grado di degradare le ammine biogene, questi sono allo stesso in tempo produttori di altre ammine biogene.

**Tabella 4.2** – Studi riguardanti la degradazione delle ammine biogene da parte dei microrganismi.

Biogenic amine	Species	Matrix	Reference
Histamine Tyramine	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	<i>In vitro</i>	Leuschner <i>et al.</i> , 1998
Histamine Tyramine	<i>B. linens</i>	Munster cheese	Leuschner & Hammes, 1998
Histamine	<i>L. sakei</i>	Ensiled fish slurry	Dapkevicius <i>et al.</i> , 2000
Histamine	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>In vitro</i>	Zaman <i>et al.</i> , 2010
Putrescine Cadaverine	<i>B. subtilis</i> , <i>St. intermedius</i>	<i>In vitro</i>	Zaman <i>et al.</i> , 2010
Histamine	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>St. carnosus</i>	Fish sauce fermentation	Zaman <i>et al.</i> , 2011
Histamine	<i>St. xylosum</i>	<i>In vitro</i>	Martuscelli <i>et al.</i> , 2000
Tyramine	<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i>	<i>In vitro</i>	Fadda <i>et al.</i> , 2001
Histamine Tyramine	<i>L. casei</i>	Cabrales cheese model	Herrero-Fresno <i>et al.</i> , 2012
Histamine Tyramine Putrescine	<i>L. casei</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Culture media	García-Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Histamine Tyramine Putrescine	<i>L. casei</i>	Wine	García-Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Tyramine Putrescine	<i>L. plantarum</i>	<i>In vitro</i>	Capozzi <i>et al.</i> , 2012
Histamine Tyramine Putrescine	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Ulocladium chartarum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i>	<i>In vitro</i> /Commercial wines	Cueva <i>et al.</i> , 2012

### 4.3 Utilizzo di additivi

Anche l'utilizzo di amino-ossidasi allo scopo di ridurre il livello di ammine biogene negli alimenti è un approccio che potrebbe dimostrare dei risvolti interessanti. Ad esempio, già nel 1985 è stata descritta la produzione a livello industriale di un'amino-ossidasi ottenuta a partire da *Aspergillus niger* IMI17454 (Hobson e Anderson, 1985). Sebbene gli autori proponessero il suo utilizzo a livello degli alimenti come i formaggi e la birra, non ci sono dati specifici che dimostrino la reale applicabilità a livello dell'industria alimentare.

Molti studi riguardano la possibilità di contrastare le ammine biogene utilizzando polifenoli estratti da matrici vegetali come i semi di melograno, il cartamo, il melone amaro, la menta e l'artemisia, oppure terpenoidi derivanti dalle spezie (pepe, zenzero, anice stellato, chiodi di garofano, finocchio, cannella e alloro). Tuttavia, questi estratti generalmente inibiscono la crescita microbica e, di conseguenza, riducono la formazione di ammine biogene; allo stesso tempo, però, alcuni estratti sono in grado di agire direttamente inibendo l'attività decarbossilasica di alcuni microrganismi (Majcherczyk e Surówka, 2019). In ogni caso, l'aggiunta dei suddetti composti è stata testata in prodotti differenti da quelli lattiero caseari, come le salsicce o altri prodotti carnei (Jaguey-Hernández, 2021).

Gorji *et al.* (2014) hanno evidenziato una significativa riduzione del contenuto di tiramina e istamina nel formaggio Gouda a seguito dell'aggiunta dell'olio essenziale estratto dalla pianta *Zataria multiflora* (tabella 4.3), il cui maggior costituente è il carvacrolo (monoterpene fenolico). È importante inoltre affermare che tutti i campioni inoculati con il suddetto olio essenziale sono stati considerati organoletticamente accettabili dal panel che ha effettuato il test sensoriale. La *Zataria multi-*

*flora* è una pianta appartenente alla famiglia delle Lamiaceae e presenta delle caratteristiche molto simili a quelle del timo (figura 4.5); si tratta di una specie proveniente dalle zone dell’Iran, del Pakistan e dell’Afghanistan. Solitamente viene essiccata e utilizzata come condimento, anche se è sempre stata utilizzata come medicinale dalle popolazioni native dei luoghi in cui è coltivata. I moderni studi farmacologici effettuati in vitro o in modelli animali hanno dimostrato degli effetti positivi della *Zataria multiflora* nei confronti delle problematiche orali e gastrointestinali come le stomatiti, le ulcere gastriche, le infezioni intestinali e la sindrome del colon irritabile (T. Shomali, 2019).



**Figura 4.5** – Pianta di *Zataria multiflora*.

**Tabella 4.3** – Effetti dell’olio essenziale (EO) estratto da *Zataria multiflora* sul contenuto di istamina e tiramina (media  $\pm$  DS) nel formaggio Gouda durante la maturazione (*The evaluation of Zatarila multiflora Boiss. Essential oil effect on biogenic amines formation and microbiological profile in Gouda cheese – Gorji et al., 2014*).

Components (mg kg <sup>-1</sup> )	EO concentrations (%v/v)	Days of analysis					
		0	15	30	45	60	90
Tyramine	0	8.93 $\pm$ 0.40 <sup>a*</sup>	84.90 $\pm$ 1.87 <sup>d</sup>	144.03 $\pm$ 2.57 <sup>d</sup>	156.37 $\pm$ 1.82 <sup>d</sup>	161.83 $\pm$ 1.70 <sup>d</sup>	172.40 $\pm$ 2.63 <sup>d</sup>
	0.05	9.15 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	83.4 $\pm$ 1.08 <sup>d</sup>	139.4 $\pm$ 3.36 <sup>ab</sup>	161.30 $\pm$ 2.79 <sup>d</sup>	160.97 $\pm$ 3.59 <sup>d</sup>	171.60 $\pm$ 2.33 <sup>d</sup>
	0.1	8.33 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	76.43 $\pm$ 1.33 <sup>ab</sup>	137.97 $\pm$ 2.07 <sup>b</sup>	159.23 $\pm$ 2.71 <sup>ab</sup>	151.63 $\pm$ 2.17 <sup>b</sup>	163.70 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>
	0.2	8.03 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	68.33 $\pm$ 1.90 <sup>c</sup>	121.17 $\pm$ 1.82 <sup>c</sup>	128.20 $\pm$ 2.62 <sup>c</sup>	132.67 $\pm$ 0.83 <sup>c</sup>	134.57 $\pm$ 1.51 <sup>c</sup>
	0.4	7.71 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	53.97 $\pm$ 1.32 <sup>d</sup>	118.67 $\pm$ 1.97 <sup>c</sup>	117.93 $\pm$ 1.31 <sup>d</sup>	122.30 $\pm$ 1.80 <sup>d</sup>	113.10 $\pm$ 1.21 <sup>d</sup>
	<i>P</i> value	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Histamine	0	6.31 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	19.13 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>	28.27 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>	33.30 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>	37.61 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>	41.57 $\pm$ 2.74 <sup>a</sup>
	0.05	5.93 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	19.20 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	27.53 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	32.60 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	37.00 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>	41.00 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>
	0.1	4.33 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	15.97 $\pm$ 1.21 <sup>ab</sup>	22.76 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>	26.22 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	31.52 $\pm$ 1.24 <sup>b</sup>	35.75 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>
	0.2	4.41 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	14.61 $\pm$ 1.40 <sup>bc</sup>	19.91 $\pm$ 1.55 <sup>bc</sup>	23.68 $\pm$ 1.60 <sup>b</sup>	28.47 $\pm$ 1.20 <sup>b</sup>	29.26 $\pm$ 1.75 <sup>c</sup>
	0.4	4.80 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	11.95 $\pm$ 1.35 <sup>c</sup>	17.60 $\pm$ 2.65 <sup>cd</sup>	18.55 $\pm$ 2.02 <sup>c</sup>	23.87 $\pm$ 1.15 <sup>c</sup>	22.20 $\pm$ 1.11 <sup>d</sup>
	<i>P</i> value	>0.05	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

\**P* value, obtained from ANOVA is listed. Means in columns without common letters are significantly different (*P* < 0.05).



## 5 Conclusioni

La presenza di ammine biogene nei prodotti lattiero caseari è una causa piuttosto comune di intossicazione alimentare, sebbene venga sottostimata e largamente trascurata. Di conseguenza, un effettivo controllo dell'incidenza di queste sostanze tossiche nei prodotti lattiero caseari risulterebbe in grado di contribuire ad alleviare l'impatto delle problematiche sanitarie di origine alimentare. Al fine di raggiungere questo obiettivo, occorrerebbe adottare un nuovo approccio relativo al controllo di queste sostanze nell'ottica di una crescente domanda di prodotti lattiero caseari minimamente elaborati da parte dei consumatori.

Questa sfida richiede l'aumento della conoscenza in merito a queste sostanze potenzialmente tossiche, alle potenziali vie di contaminazione, alle condizioni che portano alla loro produzione e inattivazione e agli effetti tossici. Inoltre, sarebbe necessario sviluppare un robusto ed efficiente programma di sorveglianza epidemiologica, al fine di verificare l'incidenza delle ammine biogene nei prodotti lattiero caseari e valutare l'efficacia delle misure applicate. Infatti, la produzione di ammine biogene nei formaggi e nei prodotti lattiero caseari dà un'indicazione sia in merito alla loro qualità che alla loro sicurezza: com'è stato dimostrato nel presente elaborato, i fattori come il pH, la concentrazione di sale, l'attività dell'acqua e il potenziale redox possono influenzare sia la crescita che le attività metaboliche dei microrganismi produttori di ammine biogene presenti nel latte e nei formaggi. Inoltre, è stato dimostrato come, al di là della carica microbica della materia prima, anche i processi tecnologici di produzione dei formaggi influiscono sulla biosintesi e sull'accumulo delle ammine biogene a livello del prodotto finito, in quanto la maturazione dei formaggi incrementa il tasso di proteolisi e gli amminoacidi liberi costituiscono il substrato utilizzabile dai microrganismi per la produzione di tali composti. Infatti, com'è stato dimostrato, maggiore è il periodo di stagionatura dei formaggi e maggiore è il contenuto di ammine biogene. Per tale motivo, sono in fase di studio parametri di conservazione (in termini di temperatura e umidità relativa) che permettano di ridurre al minimo la produzione di tali composti.

Tuttavia, al giorno d'oggi, la principale strategia per prevenire la formazione e l'accumulo di ammine biogene è la corretta scelta dei microrganismi starter da utilizzare; infatti, occorrerebbe preferire ceppi decarbossilasi-negativi oppure in grado di degradare *in situ* le ammine biogene. Inoltre, è stato dimostrato che in alcuni casi non è possibile trovare una stretta correlazione tra la conta microbica e il contenuto di ammine biogene di un campione di formaggio, in quanto la capacità di sintetizzare tali composti è ceppo-specifica. Nel presente elaborato, inoltre, è stata studiata la possibilità di utilizzare colture starter costituite da ceppi in grado di produrre batteriocine, sostanze antimicrobiche in grado di contrastare la crescita di alcuni microrganismi produttori di ammine biogene;

questo aspetto permette di evitare l'aggiunta di batteriocine come additivi, con vantaggi sia dal punto di vista dell'etichettatura (*clean label*) che dal punto di vista dei costi. Infine, per prevenire il problema è assolutamente necessario che gli operatori rispettino le corrette prassi igieniche durante la lavorazione dei prodotti e durante il loro stoccaggio.

Oggi sono in fase di sviluppo delle tecniche innovative di prevenzione e di controllo dell'accumulo di ammine biogene a livello dei prodotti lattiero caseari; gli esempi riportati nel presente elaborato riguardano l'irraggiamento e l'uso di additivi. Per quanto riguarda l'irraggiamento, è stata riscontrata una certa efficacia nella riduzione del contenuto di ammine biogene in certi tipi di formaggio senza particolari conseguenze a livello organolettico. Invece, per quanto concerne l'uso di additivi, è stata valutata l'efficacia dell'olio essenziale estratto dalla pianta *Zataria multiflora*; tra tutti gli additivi naturali testati, quest'olio vegetale è particolarmente efficiente nella riduzione del contenuto di ammine biogene e, soprattutto, non influisce in alcun modo nelle caratteristiche organolettiche del prodotto finito.

Concludendo, va tenuto presente che non è sufficiente agire con una sola strategia nel controllo delle ammine biogene nei prodotti lattiero caseari; infatti, trattandosi di sostanze che possono ritrovarsi nella materia prima e che possono anche essere prodotte a seguito dell'azione microbica, è necessario ricorrere sia a strategie preventive che degradative. Di conseguenza, sebbene queste strategie possano rappresentare un costo nell'immediato, nel lungo periodo potrebbero contribuire a ridurre notevolmente l'incidenza della problematica e, quindi, lo spreco alimentare.



## 6 Bibliografia

- Adımcılar, V., Öztekin, N., & Bedia Erim, F. (2018). A direct and sensitive analysis method for biogenic amines in dairy products by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. *Food analytical methods*, 11(5), 1374-1379.
- Aly, S. A., Farag, D. E., & Galal, E. (2012). Effect of gamma irradiation on the quality and safety of Egyptian Karish cheese. *J Am Sci*, 8(10), 761-766.
- Alvarez, M. A., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in food science & technology*, 39(2), 146-155.
- Amaya-Farfan J., Caballero B., Trugo L. C. Amino acids-properties and occurrence. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Oxford: Academic Press, Elsevier Science Ltd. 2003, 181–192.
- Arena, M. E., Fiocco, D., Manca de Nadra, M. C., Pardo, I., & Spano, G. (2007). Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. *Current microbiology*, 55(3), 205-210.
- Bardócz, S. (1999). Role of biogenic amines-summing up or what is it we do not know? *Biogenically Active Amines in Food*, Vol. III. pp 1–4. European Community, Ed.
- Benkerroum, N., & Tamime, A. Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 21(4), 399-413.
- Bodmer, S., Imark, C., & Kneubühl, M. (1999). Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation research*, 48(6), 296-300.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & In't Veld, J. H. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International journal of food microbiology*, 11(1), 73-84.
- Buňková, L., Buňka, F., Mantlová, G., Čablová, A., Sedláček, I., Švec, P., ... & Kráčmar, S. (2010). The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food microbiology*, 27(7), 880-888.
- Calles-Enríquez, M., Eriksen, B. H., Andersen, P. S., Rattray, F. P., Johansen, A. H., Fernández, M., ... & Alvarez, M. A. (2010). Sequencing and transcriptional analysis of the *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: factors that affect differential hdcA expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6231-6238.

- Calzada, J., Del Olmo, A., Picon, A., Gaya, P., & Nuñez, M. (2013). Proteolysis and biogenic amine buildup in high-pressure treated ovine milk blue-veined cheese. *Journal of dairy science*, 96(8), 4816-4829.
- Chander H., Batish V.H., Babu S., and Bhatia K.L (1988). Studies on optimal conditions for amine production by *E. coli*. *Milchwissenschaft* 43, 90–91.
- Chong, C. Y., Abu Bakar, F., Russly, A. R., Jamilah, B., & Mahyudin, N. A. (2011). The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal*, 18(3).
- Coton, E., & Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine-and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 296-304.
- Crow, V., Curry, B., & Hayes, M. (2001). The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 275-283.
- Dapkevicius, M. L. E., Nout, M. R., Rombouts, F. M., Houben, J. H., & Wymenga, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 57(1-2), 107-114.
- Edwards, S. T., & Sandine, W. E. (1981). Public health significance of amines in cheese. *Journal of Dairy Science*, 64(12), 2431-2438.
- EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Scientific opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. *Eur Food Saf Auth J* 9:2393 (2011).
- Es' hagh Gorji, M., Noori, N., Nabizadeh Nodehi, R., Jahed Khaniki, G., Rastkari, N., & Alimohammadi, M. (2014). The evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil effect on biogenic amines formation and microbiological profile in Gouda cheese. *Letters in applied microbiology*, 59(6), 621-630.
- Eun Rhee, J., Haeng Rhee, J., Youl Ryu, P., & Ho Choi, S. (2002). Identification of the cadBA operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS microbiology letters*, 208(2), 245-251.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA, ECDC), 2022. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *Efsa Journal*.

- Fernández, M., Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V., & Alvarez, M. A. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*, 74(3), 276-282.
- Friedman, M. (2010). Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chemistry & biodiversity*, 7(6), 1491-1530.
- García-Ruiz, A., González-Rompinelli, E. M., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2011). Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International journal of food microbiology*, 148(2), 115-120.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., ... & Suzzi, G. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International journal of food microbiology*, 64(1-2), 105-117.
- Gawarska, H., Sawilska-Rautenstrauch, D., Ścieżyńska, H., MinorczykMand Postupolski, J. (2012). Occurrence of free biogenic amines: tyramine, putrescine and cadaverine in fruits vegetables and their products. *Bromatol Chem Toksykol* 45:105–110.
- Gloria, M. B. A., Saraiva, P. R., RIGUEIRA, J. C., & Brandao, S. C. (2011). Bioactive amines changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 45-51.
- Guarcello, R., De Angelis, M., Settanni, L., Formiglio, S., Gaglio, R., Minervini, F., ... & Gobbetti, M. (2016). Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(23), 6870-6880.
- Halász, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5(2), 42-49.
- Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M. C., ... & Alvarez, M. A. (2012). *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International journal of food microbiology*, 157(2), 297-304.
- Hobson, J. C., & Anderson, D. A. G. (1985). Amine removal. European Patent Application N\_ EP0132674A2, Application number 84107990.8.

- Jaguey-Hernandez, Y., Aguilar-Arteaga, K., Ojeda-Ramirez, D., Anorve-Morga, J., González-Olivares, L. G., & Castaneda-Ovando, A. (2021). Biogenic amines levels in food processing: Efforts for their control in foodstuffs. *Food Research International*, 144, 110341.
- Joosten, H. M. L. J. (1988). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. Wageningen University and Research.
- Kandasamy, S., Yoo, J., Yun, J., Kang, H. B., Seol, K. H., & Ham, J. S. (2021). Quantitative analysis of biogenic amines in different cheese varieties obtained from the Korean domestic and retail markets. *Metabolites*, 11(1), 31.
- Komprda, T., Burdychová, R., Dohnal, V., Cwíková, O., Sládková, P., & Dvořáčková, H. (2008). Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*, 25(2), 219-227.
- Koutsoumanis A, Tassou C, Nychas GJE. 2010. Biogenic amines in foods. In: Juneja VK, Sofos JN, editors. *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington: ASM Press. p 248–74.
- Kurbanoglu, S., Erkmen, C., & Uslu, B. (2020). Frontiers in electrochemical enzyme-based biosensors for food and drug analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115809.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367-381.
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., & Alvarez, M. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145-156.
- Ladero, V., Linares, D. M., Fernández, M., & Alvarez, M. A. (2008). Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: relation with histamine content. *Food research international*, 41(10), 1015-1019.
- Ladero, V., Sánchez-Llana, E., Fernández, M., & Alvarez, M. A. (2011). Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International journal of food science & technology*, 46(3), 516-521.
- La Gioia, F., Rizzotti, L., Rossi, F., Gardini, F., Tabanelli, G., & Torriani, S. (2011). Identification of a tyrosine decarboxylase gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and analysis of its expression and tyramine production in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1140-1144.

- Lange, J., & Wittmann, C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 372(2), 276-283.
- Lass, A., Suessenbacher, A., Wölkart, G., Mayer, B., & Brunner, F. (2002). Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Molecular pharmacology*, 61(5), 1081-1088.
- Lee, Y. H., Kim, B. H., Kim, J. H., Yoon, W. S., Bang, S. H., & Park, Y. K. (2007). CadC has a global translational effect during acid adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2417-2425.
- Lehane, L., & Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *International journal of food microbiology*, 58(1-2), 1-37.
- LEUSCHNER, R. G., & Hammes, W. P. (1998). Degradation of histamine and tyramine by *Brevibacterium linens* during surface ripening of Munster cheese. *Journal of Food Protection*, 61(7), 874-878.
- Lewis, M. J. (2003). Improvements in the pasteurisation and sterilisation of milk. *Dairy Processing: Improving Quality*, 81-103.
- Linares, D. M., Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M. A., & Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(7), 691-703.
- Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C., & Álvarez, M. A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in microbiology*, 3, 180.
- Lyte, M. (2004). The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa. *Journal of food protection*, 67(5), 878-883.
- Lucas, P. M., Wolken, W. A., Claisse, O., Lolkema, J. S., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1417-1424.
- Mah, J. H., & Hwang, H. J. (2009). Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosum* as a protective culture. *Food Control*, 20(9), 796-801.
- Maintz, L., & Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American journal of clinical nutrition*, 85(5), 1185-1196.



- Majcherczyk, J., & Surówka, K. (2019). Effects of onion or caraway on the formation of biogenic amines during sauerkraut fermentation and refrigerated storage. *Food chemistry*, 298, 125083.
- Marcobal, A., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, M. V., & Munoz, R. (2006). Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM83. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7954-7958.
- Marcos, A. (1993). Water activity in cheese in relation to composition, stability and safety. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (pp. 439-469). Springer, Boston, MA.
- Martuscelli, M., Gardini, F., Torriani, S., Mastrocola, D., Serio, A., Chaves-López, C., ... & Suzzi, G. (2005). Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 571-578.
- Masters, P. M., & Friedman, M. (1979). Racemization of amino acids in alkali-treated food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(3), 507-511.
- Meng, S. Y., & Bennett, G. (1992). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *Journal of bacteriology*, 174(8), 2659-2669.
- Mietz, J. L., & Karmas, E. (1978). Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 61(1), 139-145.
- Molenaar, D., Bosscher, J. S., ten Brink, B., Driessen, A. J., & Konings, W. N. (1993). Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*, 175(10), 2864-2870.
- Moreno-Arribas, V., & Lonvaud-Funel, A. (1999). Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS microbiology letters*, 180(1), 55-60.
- Muir, D. D., & Banks, J. M. (2003). Factors affecting the shelf-life of milk and milk products. *Dairy processing: improving quality*, 185-207.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., & Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food: existing and emerging approaches. *Journal of food science*, 75(7), R139-R150.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G. C., Bremer, P., & Meerdink, G. (2012). Histamine degradation by diamine oxidase, *Lactobacillus* and *Virgibacillus halodonitrificans* Nai18. *Journal of Food Processing and Technology*, 3(6).

- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2003). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of food science*, 68(3), 750-756.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Roig-Sagués, A. X., Trujillo-Mesa, A. J., & Vidal-Carou, M. C. (2002). Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2471-2478.
- O'Sullivan, D. J., Fallico, V., O'Sullivan, O., McSweeney, P. L., Sheehan, J. J., Cotter, P. D., & Giblin, L. (2015). High-throughput DNA sequencing to survey bacterial histidine and tyrosine decarboxylases in raw milk cheeses. *Bmc Microbiology*, 15(1), 1-12.
- Park, Y. K., Bearson, B., Bang, S. H., Bang, I. S., & Foster, J. W. (1996). Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology*, 20(3), 605-611.
- Pekcici, M. E., Guler, E., & Topkafa, M. (2021). Biogenic amine contents in Turkish dairy products: determination and comparison. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(5), 4119-4127.
- Premont, R. T., Gainetdinov, R. R., & Caron, M. G. (2001). Following the trace of elusive amines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9474-9475.
- Pundir, C. S., Deswal, R., & Narwal, V. (2018). Quantitative analysis of hydrogen peroxide with special emphasis on biosensors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41(3), 313-329.
- Rabie, M. A., Elsaidy, S., el-Badawy, A. A., Siliha, H., & Malcata, F. X. (2011). Biogenic amine contents in selected Egyptian fermented foods as determined by ion-exchange chromatography. *Journal of food protection*, 74(4), 681-685.
- Rabie, M. A., Toliba, A. O., Sulieman, A. R., & Malcata, F. X. (2014). Changes in biogenic amine contents throughout storage of canned fish products. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 24(3), 137-150.
- Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J. R., Martín, M. C., Fernández, M., & Alvarez, M. A. (2013). A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1029-1035.

- Reij, M. W., Den Aantrekker, E. D., & ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International journal of food microbiology*, 91(1), 1-11.
- Reinholds, I., Rusko, J., Pugajeva, I., Berzina, Z., Jansons, M., Kirilina-Gutmane, O., ... & Bartkevics, V. (2020). The occurrence and dietary exposure assessment of mycotoxins, biogenic amines, and heavy metals in mould-ripened blue cheeses. *Foods*, 9(1), 93.
- Reyes, E., Diezhandino, I., Fernandez, D., Ferrazza, R. E., Tornadijo, M. E., & Fresno, J. M. (2014). Effect of autochthonous starter cultures on the biogenic amine content of ewe's milk cheese throughout ripening. *Food microbiology*, 44, 271-277.
- Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. (2019). Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*, 8(2), 62.
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2005). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, 44(7-8), 489-599.
- Santos, M. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International journal of food microbiology*, 29(2-3), 213-231.
- Scheller, F. W., Yarman, A., Bachmann, T., Hirsch, T., Kubick, S., Renneberg, R., ... & Bier, F. F. (2013). Future of biosensors: a personal view. *Biosensors based on aptamers and enzymes*, 1-28.
- Schelp, E., Worley, S., Monzingo, A. F., Ernst, S., & Robertus, J. D. (2001). pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. *Journal of molecular biology*, 306(4), 727-732.
- Schiller, D., Kruse, D., Kneifel, H., Krämer, R., & Burkovski, A. (2000). Polyamine transport and role of potE in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 6247-6249.
- Schirone, M., Visciano, P., Conte, F., & Paparella, A. (2022). Formation of biogenic amines in the cheese production chain: favouring and hindering factors. *International Dairy Journal*, 105420.
- Serio, A., Paparella, A., Chaves-Lopez, C., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2007). *Enterococcus* populations in Pecorino Abruzzese cheese: biodiversity and safety aspects. *Journal of food protection*, 70(7), 1561-1568.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food research international*, 29(7), 675-690.

- Shalaby, A. R., Anwar, M. M., Sallam, E. M., & Emam, W. H. (2016). Quality and safety of irradiated food regarding biogenic amines: Ras cheese. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(4), 1048-1054.
- Shomali, T. (2019). *Zataria multiflora* and Gastrointestinal Tract Disorders. In *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases* (pp. 209-212). Academic Press.
- Singh, S., Kumar, V., Dhanjal, D. S., Datta, S., Prasad, R., & Singh, J. (2020). Biological biosensors for monitoring and diagnosis. In *Microbial biotechnology: basic research and applications* (pp. 317-335). Springer, Singapore.
- Smit, A. Y., Du Toit, W. J., & Du Toit, M. (2008). Biogenic amines in wine: understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29(2), 109-127.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., ... & Lolkema, J. S. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European journal of clinical nutrition*, 64(3), S95-S100.
- Straub, B. W., Tichaczek, P. S., Kicherer, M., & Hammes, W. P. (1994). Formation of tyramine by *Lactobacillus curvatus* LTH 972. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 199(1), 9-12.
- Sumner, S. S., Roche, F., & Taylor, S. L. (1990). Factors controlling histamine production in Swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Dairy Science*, 73(11), 3050-3058.
- Tabanelli, G., Montanari, C., Bargossi, E., Lanciotti, R., Gatto, V., Felis, G., ... & Gardini, F. (2014). Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 14-23.
- Taylor, S.L. and Sumner, S.S. (1986). Determination of histamine, putrescine, and cadaverine. In: *Seafood Quality Determination*, pp. 235–245. Kramer, D.E. and Liston, J., Eds., Elsevier, Amsterdam.
- Taylor, S. L., & World Health Organization. (1985). Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods (No. VPH/FOS/85.1). World Health Organization.
- Teodorovic, V., Buncic, S., & Smiljanic, D. (1994). A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtschaft* (Germany).

- Tkachenko, A., Nesterova, L., & Pshenichnov, M. (2001). The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Archives of microbiology*, 176(1), 155-157.
- Tsakalidou E. 2011. Microbial flora. In: Nollet LML, Toldra, editors. Safety analysis of foods of animal origin Part III: Milk and dairy foods. Boca Raton: CRC. p 781–98.
- Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1), 187-216.
- Varnam, A., & Sutherland, J. P. (2001). *Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Verma, N., Hooda, V., Gahlaut, A., Gothwal, A., & Hooda, V. (2020). Enzymatic biosensors for the quantification of biogenic amines: A literature update. *Critical reviews in biotechnology*, 40(1), 1-14.
- Vido, K., Le Bars, D., Mistou, M. Y., Anglade, P., Gruss, A., & Gaudu, P. (2004). Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system. *Journal of Bacteriology*, 186(6), 1648-1657.
- Wöhrl, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K., & Jarisch, R. (2004, September). Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. In *Allergy & Asthma Proceedings* (Vol. 25, No. 5).
- Wójcik, W., Łukasiewicz, M., & Puppel, K. (2021). Biogenic amines: formation, action and toxicity—a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2634-2640.
- Xu, Y., Xia, W., Yang, F., Kim, J. M., & Nie, X. (2010). Effect of fermentation temperature on the microbial and physicochemical properties of silver carp sausages inoculated with *Pediococcus pentosaceus*. *Food Chemistry*, 118(3), 512-518.
- Zdolec, N., Bogdanović, T., Severin, K., Dobranić, V., Kazazić, S., Grbavac, J., ... & Kiš, M. (2021). Biogenic amine content in retailed cheese varieties produced with commercial bacterial or mold cultures. *Processes*, 10(1), 10.
- Reg, 2005. Regolamento (CE) n.2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 “Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari”. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea*, 22.12.2005, L 338, 1.