

# CONTENUTO DI AMINE BIOGENE E CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DEL FORMAGGIO DI FOSSA

## ***BIOGENIC AMINE CONTENT AND CHEMICAL AND PHYSICAL FEATURES OF ITALIAN FORMAGGIO DI FOSSA***

Mascaro N.<sup>1</sup>, Stocchi R.<sup>1</sup>, Ricciutelli M.<sup>2</sup>, Cammertoni N.<sup>1</sup>, Renzi F.<sup>1</sup>, Cecchini S.<sup>1</sup>, Loschi A.R.<sup>1</sup>, Rea S.<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie - Università di Camerino

<sup>(2)</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche - Università di Camerino

### **SUMMARY**

Formaggio di Fossa is an Italian traditional cheese of the Montefeltro area (Emilia Romagna and Marche regions) characterized by a particular step of ripening that is carried out into pits (*infossamento*) borne in the sandstone. Since the XIV century, the inhabitants were used to set food, especially cereals and cheese, into pits to preserve them during winter and to protect them from invaders. The aim of the present work is to study physical and chemical features of this product with particular reference to the presence of the most important biogenic amines (-Phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermine and spermidine), compared with a control cheese fully ripened in factory. Formaggio di Fossa showed higher values of Aw, pH, humidity, proteins, pH 4,6-soluble nitrogen (NCN) and water soluble nitrogen (NPN) and much lower amounts of fat. Much higher amounts of total biogenic amines were detected in Formaggio di Fossa than in control cheese, where their concentration was very low. Cadaverine, putrescine and tyramine were the most concentrated biogenic amines. Nevertheless, tyramine was present at levels suggested as compatible with GMPs. Histamine was detected at low amounts, far from potentially toxic levels.

### **Key words**

Formaggio di Fossa, biogenic amines, chemical and physical features

### **INTRODUZIONE**

Il Formaggio di Fossa è un prodotto tradizionale italiano dell'area del Montefeltro, compresa tra le regioni Emilia-Romagna e Marche, caratterizzato da una particolare fase di maturazione, l'infossamento, che lo lega indissolubilmente alle terre malatestiane da cui origina. Qui, infatti, sono ubicate le tipiche fosse tronco-coniche scavate nella roccia arenaria in cui, sin dal XIV secolo, gli abitanti solevano porre i cibi per conservarli durante il rigido inverno e proteggerli dalle razzie degli invasori. Viene fabbricato a partire da latte ovino, vaccino o misto in diverse proporzioni, crudo o pastorizzato. Una prima maturazione in caseificio della durata di circa 2 mesi è seguita da una fase di stagionatura in fossa all'interno della quale i formaggi, dopo essere stati ripuliti dalla muffa e chiusi in sacchi di tela contrassegnati, soggiornano per 90-100 giorni. L'infossamento

viene tradizionalmente effettuato tra luglio ed agosto in fosse sanificate mediante fuoco e fumo e preparate ad accogliere il formaggio attraverso l'allestimento di un rivestimento di canne e paglia, che separa il prodotto dalle pareti di roccia, e di un pavimento sopraelevato di tavole di legno, per permettere la raccolta sul fondo della fossa del grasso che percola dalle forme durante la maturazione (1). L'ambiente anaerobio presente all'interno della fossa favorisce i processi enzimatici fermentativi, proteolitici e lipolitici, indispensabili per lo sviluppo delle caratteristiche organolettiche tipiche del prodotto. I processi proteolitici, tuttavia, a causa dell'incremento del contenuto di aminoacidi liberi (2), determinano in questo formaggio, così come in altri prodotti fermentati e stagionati, il rischio di formazione di amine biogene. Tali sostanze, prodotte prevalentemente ad opera di decarbossilasi batteriche, possono avere molteplici effetti sull'organismo, tra i

quali alterazioni della pressione arteriosa, aumento della gittata cardiaca, crampi addominali, vomito, diarrea, rush cutanei, emicrania, iperglicemia, eccitazione della muscolatura liscia del sistema respiratorio, del tratto gastrointestinale e dell'utero. Entità e gravità degli effetti dipendono essenzialmente dalla quantità ingerita e dalla capacità da parte dell'organismo di metabolizzare tali sostanze. Esse, pertanto, rivestono un'importanza particolare in alcune categorie a rischio, nelle quali i meccanismi di detossificazione presenti a livello di apparato digerente (MAO, DAO e HMT) sono deficitari, carenti o immaturi. Inoltre, la presenza di amine biogene negli alimenti, in particolare di -fenilettilamina, putrescina, cadaverina, tiramina e istamina, può rappresentare anche un importante indicatore igienico-sanitario sia della qualità della materia prima, che dell'applicazione delle GMP (3, 4).

Nel presente lavoro vengono descritte le principali caratteristiche fisico-chimiche del Formaggio di Fossa e indagati gli effetti dell'infossamento su di esse, con particolare riferimento all'eventuale presenza di amine biogene.

## MATERIALI E METODI

Sono state esaminate tre forme di Formaggio di Fossa appartenenti a un unico lotto di produzione, fabbricate con latte ovino pastorizzato addizionato con starter microbici commerciali e infossate per 90 giorni. Le condizioni di umidità relativa e di temperatura della fossa sono state monitorate in continuo mediante Datalogger 42270 (Extech Instruments, Waltham, MA, USA). Per ogni forma sono stati prelevati tre campioni che sono stati sottoposti alle seguenti determinazioni: pH mediante la metodica descritta da Bendall (5); Aw mediante apparecchiatura BT RS1 Rotronic Hygroskop (PBI International, Milano); umidità, ceneri e NaCl secondo le metodiche A.O.A.C. (6); proteine mediante metodo Kjeldahl; grassi secondo la metodica Schmidt-Bondzynsky-Ratzlaff (7) modificata; azoto solubile a pH 4,6 (azoto non caseinico, NCN) e azoto solubile in acqua (azoto

non proteico, NPN) secondo il metodo di Resmini et al. (8) modificato; principali amine biogene, quali istamina, tiramina, -fenilettilamina, putrescina, cadaverina, spermina e spermidina mediante la metodica di Senöz et al. (9), modificata da Rea et al. (10). Tale metodica prevede l'estrazione in acido tricloroacetico e la successiva derivatizzazione con dansile cloruro, prima dell'analisi HPLC effettuata mediante apparecchiatura Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) con rivelatore spettrofotometrico a lunghezza d'onda variabile VWD-1200 Series (Agilent Technologies) per la separazione e l'identificazione delle diverse amine biogene e la valutazione della capacità di recupero della metodica impiegata. Il recupero percentuale è stato calcolato per ciascuna amina, determinando il rapporto fra la differenza di concentrazione prima e dopo l'aggiunta dell'amina standard al campione e la quantità di amina standard aggiunta, moltiplicando poi tale rapporto per 100.

Al fine di valutare l'effetto dell'infossamento, le indagini suddette sono state effettuate anche su tre forme di formaggio appartenenti allo stesso lotto di produzione impiegate come controllo e sottoposte a maturazione in caseificio in condizioni controllate (temperatura 15°C circa e umidità relativa 80-90%) per un tempo corrispondente a quello del prodotto infossato.

## RISULTATI

I valori di temperatura rilevati all'interno della fossa hanno mostrato un progressivo incremento da 19,4°C iniziali a 24,0°C dopo 50 giorni dall'infossamento, per poi diminuire in maniera altrettanto progressiva fino a raggiungere 20,5°C circa nei giorni immediatamente precedenti l'estrazione. L'umidità relativa è aumentata progressivamente dal valore iniziale di 81,7% fino a stabilizzarsi a 99,9% dopo 53 giorni.

Come si può osservare in tabella 1, nella quale vengono riportati i risultati relativi alle caratteristiche fisico-chimiche del Formaggio di Fossa e del

Tabella 1 - Caratteristiche fisico-chimiche (media  $\pm$  d.s.) del Formaggio di Fossa e del formaggio di controllo

Campioni	AW	pH	Umidità %	Ceneri %	Proteine %	Grassi %	NCN %	NPN %	NaCl %
Fossa	0,92 $\pm$ 0,00	5,54 $\pm$ 0,02	37,21 $\pm$ 0,11	4,19 $\pm$ 0,02	24,65 $\pm$ 1,83	33,95 $\pm$ 0,19	1,17 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,00
Controllo	0,91 $\pm$ 0,00	5,26 $\pm$ 0,02	31,12 $\pm$ 0,11	5,49 $\pm$ 0,01	21,08 $\pm$ 2,16	42,31 $\pm$ 0,13	0,62 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,00	1,78 $\pm$ 0,00

formaggio di controllo, i campioni delle forme sottoposte a stagionatura in fossa hanno mostrato valori medi di Aw, pH, NCN, NPN, umidità e proteine superiori rispetto a quelli rilevati nelle forme stagionate in caseificio, nelle quali è stato osservato, invece, un maggior contenuto di grassi e NaCl.

Le percentuali di recupero delle amine biogene sono risultate elevate con valori medi che, come riportato in tabella 2, oscillano fra 94,36% della tiramina e 106,26% della -fenilettilamina. Infine, come si può osservare in tabella 3, nella quale vengono riportate le concentrazioni di amine biogene rilevate, i campioni di prodotto infossato hanno evidenziato un contenuto totale medio notevolmente superiore rispetto a quello dei campioni di formaggio di controllo. In particolare, mentre in quest'ultimo sono state rilevate esclusivamente putrescina, tiramina e spermina, peraltro in piccole quantità, nel Formaggio di Fossa tutte le amine biogene ricercate hanno evidenziato elevate concentrazioni, ad eccezione dell'istamina, scarsamente presente, e della spermina, completamente assente.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Le sostanziali differenze nelle caratteristiche fisico-chimiche e nel contenuto di amine biogene evidenziate tra i campioni di Formaggio di Fossa e quelli del formaggio di controllo permettono di avanzare alcune considerazioni relative all'influenza esercitata dal particolare ambiente di stagionatura nella maturazione di questo peculiare prodotto caseario.

In particolare, l'elevato tasso di umidità relativa presente all'interno delle fosse è responsabile di tenori di Aw e di umidità più elevati nel prodotto

infossato rispetto a quello maturato in caseificio, come osservato anche da altri autori in analoghe indagini (11, 12). I valori di pH più alti rilevati nel Formaggio di Fossa anche in altri studi (11), sono verosimilmente da ricondurre alla maggior concentrazione di composti azotati di origine proteolitica (NCN e NPN) conseguenti alla ripresa delle attività microbiche durante la maturazione, favorita dalle temperature più elevate presenti all'interno delle fosse. Percentuali di NCN e NPN analoghe a quelle riscontrate nei campioni di Formaggio di Fossa oggetto del presente studio sono state evidenziate anche da altri autori (13, 11). Le particolari condizioni di temperatura dell'ambiente di stagionatura influenzano anche la composizione centesimale del prodotto. Infatti, il più basso contenuto lipidico osservato nel formaggio infossato, i cui valori risultano in accordo con quanto riportato in altri studi su prodotti della stessa tipologia (11, 13), sono legati soprattutto alla trasudazione dei grassi durante la maturazione. Tale fenomeno appare particolarmente evidente durante lo sfossamento, quando si apprezza sul fondo della fossa un'abbondante raccolta di grasso liquido. Strettamente influenzata dalle differenti percentuali di umidità e contenuto lipidico tra le due tipologie di campioni, è la concentrazione di proteine totali, che risulta più elevata nel Formaggio di Fossa, mostrando anche in questo caso corrispondenza con i dati bibliografici (11, 13).

Le condizioni microambientali della fossa, che favoriscono i processi degradativi dei costituenti proteici, si sono dimostrate tali da determinare anche un evidente incremento della concentrazione di amine biogene, in particolare di cadaverina, putrescina e tiramina. Tale dato appare compatibile con il profilo aminoacidico delle caseine e delle sieroproteine del latte, notoriamente caratterizzato dalla

Tabella 2 - Recupero percentuale delle amine biogene

$\beta$ -fenilettilamina	Putrescina	Cadaverina	Istamina	Tiramina	Spermidina	Spermina
106,26	101,48	100,56	99,90	94,36	103,94	95,47

Tabella 3 - Contenuto medio ( $\pm$  d.s.) in amine biogene (ppm) nel Formaggio di Fossa e nel formaggio di controllo

Campioni	$\beta$ -fenilettilamina	Putrescina	Cadaverina	Istamina	Tiramina	Spermidina	Spermina	Totale
<b>Fossa</b>	173,0 $\pm$ 39,13	579,60 $\pm$ 0,88	1302,86 $\pm$ 5,02	24,11 $\pm$ 10,06	461,62 $\pm$ 11,99	16,49 $\pm$ 0,31	0	2557,69 $\pm$ 39,13
<b>Controllo</b>	0	18,57 $\pm$ 0,03	0	0	24,92 $\pm$ 0,18	0	27,58 $\pm$ 0,02	71,07 $\pm$ 0,00

prevalenza di lisina, glutamina e tirosina (14, 15), rispettivi precursori delle suddette amine biogene. Tuttavia, la concentrazione di tiramina rilevata nel Formaggio di Fossa risulta ampiamente compresa entro 800ppm, considerato da alcuni autori (16, 17) come limite di tossicità, mentre da altri come valore massimo compatibile con le GMP (3). Inoltre, il contenuto di istamina, ritenuta l'amina biogena maggiormente tossica, è risultato particolarmente modesto, ben lontano dalle concentrazioni considerate potenzialmente pericolose per la salute dei consumatori (3). E' comunque opportuno sottolineare che l'assenza di studi relativi al contenuto di amine biogene nel Formaggio di Fossa non permette di confrontare con altri dati i risultati ottenuti nel presente lavoro.

Infine, la percentuale di recupero delle diverse amine biogene risulta ampiamente superiore a 88%, valore indicato come limite soddisfacente (18), confermando l'estrema versatilità della metodica impiegata (19).

In conclusione, è possibile affermare che la presenza nel Formaggio di Fossa di istamina e di tiramina in concentrazioni notevolmente al di sotto dei valori considerati pericolosi o potenzialmente tali induce a considerare il prodotto esaminato sufficientemente sicuro dal punto di vista sanitario, sebbene l'elevata concentrazione complessiva di amine biogene potrebbe destare dubbi sul rispetto rigoroso delle norme igieniche nel corso della fabbricazione. Tuttavia, tali dubbi sono fugati dalle concentrazioni estremamente limitate di questi composti rilevate nel formaggio di controllo. La cospicua presenza di amine biogene, associata ad adeguate garanzie igienico-sanitarie, potrebbe piuttosto essere considerata come elemento favorevole che, unitamente ad altre sostanze di origine proteica e lipidica che si formano grazie alla ripresa della fermentazione nel corso della maturazione in fossa, contribuisce alla formazione delle spiccate caratteristiche di aroma, odore e sapore tipiche del prodotto.

Alla luce di quanto precedentemente affermato, sono in corso studi relativi al profilo microbico del prodotto, allo scopo di evidenziare le popolazioni batteriche e fungine eventualmente coinvolte nella produzione di amine biogene. Una più approfondita e completa conoscenza delle caratteristiche del Formaggio di Fossa potrà contribuire alla valorizzazione di questo prodotto tradizionale così antico e complesso, attualmente in regime di protezione transitoria nazionale ai sensi dell'art. 5 del Reg. CE 510/2006 (20), in attesa del riconoscimento del marchio di Denominazione di Origine Protetta.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Disciplinary di produzione "Formaggio di Fossa di Sogliano" DOP. Pagina Internet: <http://www.politicheagricole.it/ProdottiQualita/default>
- 2) Farkye N.Y. (2000). Microbiology of cheese making and maturation. In: Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D. *Encyclopedia of food microbiology*, Vol. 1. Academic Press, London, UK, 381-387.
- 3) Shalaby A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29 (7), 675-690.
- 4) Rea S., Mascaro N., Cecchini S., Stocchi R., Loschi A.R., Ricciutelli M. (2008). Indagine sulla presenza di amine biogene in differenti prodotti alimentari di origine animale. *Industrie Alimentari*, 47 (484), 983-990.
- 5) Bendall J.R. (1975). Cold contracture and ATP turnover in the red and white musculature of the pig, post-mortem. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26 (1), 55-71.
- 6) A.O.A.C. (1990). Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> Ed. A.O.A.C, Washington D.C., U.S.A.
- 7) Tateo F., Bonomi M. (2003). Guida all'analisi chimica degli alimenti. Vol. 1: Latte e derivati. Ars Edizioni Informatiche, Milano.
- 8) Resmini P., Tripiciano C., Rampilli M., Lodi R. (1985). Alcuni aspetti del controllo di qualità del latte al consumo. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione*, 14 (3), 187.
- 9) Senöz B., Iikli N., Çoksöyler N. (2000). Biogenic amines in Turkish sausages (sukuks). *Journal of Food Science*, 65, 764-767.
- 10) ea S., Ricciutelli M., Cecchini S., Pacifici L., Stocchi R., Loschi A.R. (2005). Contenuto di amine biogene nel corso della stagionatura nel salame lardellato, prodotto tradizionale dell'Italia centrale. *Italian Journal of Food Science*, 17 (2), 211-220.
- 11) Gobetti M., Folkertsma B., Fox P.F., Corsetti A., Smacchi E., De Angelis M., Rossi J., Kilcawley K., Cortini M. (1999). Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. *International Dairy Journal*, 9, 763-773.
- 12) Pozzetto G. (2000). C'era una volta il Formaggio di Fossa. C'è ancora? Panozzo Editore, Rimini.
- 13) Avellini P., Clementi F., Trabalza Marinucci M., Cenci Goga B., Rea S., Branciaro R., Cavallucci C., Reali C., Di Antonio E. (1999). "Pit" Cheese: compositional microbiological and sensory characteristics. *Italian Journal of Food Science*, 11 (4), 317-333.
- 14) Salvadori del Prato O. (2001). Trattato di tecnologia casearia. Calderini Edagricole, Bologna.
- 15) Cantarelli C. (1984). Principi di tecnologia delle industrie agrarie. Edagricole, Bologna.
- 16) Brink B.T., Damink C., Joosten H.M.L.J., Huis in't Veld J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73.
- 17) Nout M.J.R. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Research International*, 27, 291-298.

- 18) Hernández-Jover T., Izquierdo-Pulido M., Veciana-Nogués M.T., Vidal-Carou M.C. (1996). Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (9), 2710-2715.
- 19) Rea S., Mascaro N., Cecchini S., Stocchi R., Loschi A.R., Ricciutelli M. (2008). Metodo di estrazione delle amine biogene e valutazione della capacità di recupero da matrici alimentari diverse. *Industrie Alimentari*, 47 (7-8), 752-757.
- 20) Regolamento (CE) N. 510/2006 del Consiglio del 20 marzo 2006 relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli e alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 93 del 31/3/2006.