

# INDAGINE SULLA PREVALENZA DELLE AMMINE BIOGENE NEL PECORINO TOSCANO D.O.P. STAGIONATO

## *PREVALENCE OF BYOGENES AMMINS IN SEASONED D.O.P. CHEESE TOSCANO PECORINO*

Bavazzano P., Bocchetti M., Cianti L., Colzi A., Leandri A., Munaò G., Perico A.  
Asl 10 di Firenze Dipartimento della Prevenzione

### **SUMMARY**

Pecorino cheese is one of the "D.O.P." products made in Tuscany. There are two types of pecorino cheese one of which undergoes a curing time period which is not less than four months. Considering this curing time period, processes are conceivable that could lead to the formation of amines such as free amino acids. The biogenic amines have unquestionable effects on health in particular histamine and tyramine, they are also important indicators of hygienic quality of the profile of the movement shortly after the curing time period and included in the shelf life period which the product is commercialized.

### **KEYWORDS**

cheese, biogenic ammins, milk proteins, chromatography.

### **INTRODUZIONE**

Il Pecorino Toscano è un formaggio a denominazione di origine protetta (Reg. CE n.1263/96 - GUCE L. 163/96 del 02.07.1996), a pasta tenera o semidura, è prodotto con solo latte di pecora in forme da uno a tre chilogrammi, di forma cilindrica di 20 cm mediamente di diametro, a faccia piatta con scalzo di 7 - 11 cm.. Secondo quanto previsto dal disciplinare il latte impiegato per la produzione proviene dalla Toscana e da alcuni comuni limitrofi di Lazio e Umbria.

Attualmente sono associati al consorzio 16 caseifici, 2 stagionatori, 1 confezionatore mentre 1 cooperativa di produttori ha il ciclo completo. La produzione venduta del 2009 è stata di 2.200.000 Kg di prodotto finito diviso in 1.300.000 Kg di prodotto fresco e 900.000 Kg di prodotto stagionato.

Secondo quanto previsto dal disciplinare il latte, eventualmente inoculato con colture di fermenti lattici naturali ed autoctoni dell'area di produzione, deve essere coagulato con caglio di vitello ad una temperatura compresa tra i 35 °C e i 38 °C per ottenere la coagulazione entro 20-25 minuti. Si procede quindi alla rottura della

cagliata producendo grani di dimensioni variabili a secondo se destinati alla produzione del fresco o dello stagionato. Per la preparazione di quest'ultima tipologia la cagliata potrà altresì essere sottoposta ad un trattamento termico (cottura) a 40-42 °C per 10-15 minuti. Il prodotto è sottoposto a stufatura a vapore per un periodo variante da 30 a 150 minuti. La salatura può essere effettuata in salamoia al 17-19% di cloruro di sodio oppure con aggiunta diretta di sale. Il formaggio deve essere maturato in idonee celle ad una temperatura di 8-10 °C e con umidità relativa dell'80-90%, per un periodo non inferiore ai venti giorni per il tipo a pasta tenera e non inferiore a quattro mesi per la tipologia a pasta semi-dura.

E' stato scritto molto relativamente alla microbiologia del pecorino e anche relativamente al pericolo microbiologico e dai dati presenti in letteratura si ricava che il pericolo microbiologico, per il formaggio stagionato oltre 4 mesi non rappresenterebbe un livello di rischio significativo. Diverse sono le considerazioni relative alle Ammine Biogene (AB) poiché la stagionatura favorisce un'intensa attività proteolitica con aumento degli

aminoacidi liberi e del NTN in generale, favorita dal fatto che anche a termine dei quattro mesi di stagionatura il contenuto di acqua comunque non scende sotto il 32%.

Relativamente alla gravità del pericolo AB, esse sono normalmente degradate per via enzimatica a livello intestinale in consumatori sani adulti principalmente per opera delle monoamminossidasi (MAO) e delle diamminossidasi (DAO) ma in soggetti con carenza di questi enzimi conseguente a condizioni congenite o acquisite (entero e/o epatopatie) i meccanismi degradativi vengono meno e le AB sono assorbite tal quali dall'intestino con riflessi importanti su diversi apparati: in primo luogo sull'apparato vascolare e quindi su quello enterico e su quello nervoso. Alla sintomatologia propria delle intossicazioni alimentari va associata la cefalea, tipica dell'intossicazione da tiramina. Titoli elevati di questa AB sono noti in diversi formaggi. Ancora bisogna ricordare che particolari condizioni possono potenziare l'effetto delle AB ed in particolare dell'Istamina: farmaci antidepressivi, antistaminici e antimalarici deprimono le monoamminossidasi, le diamminossidasi e le istamina-metil transferasi. Infine dobbiamo tener conto della sinergia tra le diverse ammine così che alcune svolgono funzioni di potenziatori dell'effetto di altre: è noto come cadaverina e putrescina interferiscano su processi di decarbossilazione esaltando l'effetto complessivo delle ammine assunte. In tal senso la composizione globale del pasto può essere determinante dell'effetto tossico delle singole dosi di ammine ingerite.

L'obiettivo dello studio è stato quello di definire le dinamiche della produzione di AB in un formaggio a lunga stagionatura al fine di individuare eventuali aree di rischio per lo specifico pericolo da sottoporre ad ulteriore approfondimento.

## MATERIALI E METODI

Sono stati presi in considerazione tre caseifici aderenti al consorzio dei produttori del pecorino toscano DOP. Con i tre caseifici si è proceduto a concordare nell'ambito della produzione ordinaria aderente alle prescrizioni dello specifico disciplinare una campionatura di pecorino toscano a lunga stagionatura. La campionatura è stata prevista fino a termine della shelf life mediamente prevista per il prodotto ovvero 8 mesi quindi si sono programmati campioni a 2, 4, 6 e 8 mesi rappresentati da una forma di media dimensione ovvero circa 2 Kg.

Da ogni campione sono state ottenute 30

aliquote da 4 grammi ciascuna nell'intento di ottenere una rappresentazione statisticamente significativa del dell'intero campione.

La fase di preparazione dei campioni di formaggio può essere così schematizzata:

1. Estrazione degli analiti mediante omogeneizzazione in ambiente acido (40 ml di HCl 1 M per 4 grammi di formaggio) con mixer a lame
2. Separazione dei grassi mediante raffreddamento a -20°C
3. Centrifugazione a 4000 rpm per 10' e raccolta dello strato acquoso
4. Filtrazione su filtro monouso in acetato di cellulosa (diametro 25 mm, porosità 0,45 µm)

L'analisi strumentale viene eseguita in Cromatografia liquida ad elevate prestazioni in fase inversa (RP-HPLC) in presenza di un reagente ion pairing (ottansolfonato sodico) con derivatizzazione post colonna con o-ftalaldeide (OPA) e rivelazione spettrofluorimetrica

Il sistema cromatografico utilizzato è così costituito:

1. Apparecchio HPLC Shimadzu con rivelatore spettrofluorimetrico e sistema di pompaggio a bassa pressione di tipo quaternario. Software per elaborazione dei dati cromatografici e il controllo dei parametri strumentali Class VP
2. Derivatizzatore post colonna costituito da un pompa isocratica e cella di reazione termostata (Labservice)
3. Colonna HPLC Luna C18 da 250 x 4,6 mm con particelle di granulometria 5 µm (Phenomenex)

Le condizioni di analisi utilizzate sono le seguenti:

### Separazione cromatografica

Flusso 1,0 ml/min

Fase mobile A Tampone acetato pH 5,3 contenente Ottansolfonato sodico 5 mM

Fase mobile B Tampone acetato pH 4,5/Acetonitrile (70:35)

Gradiente di concentrazione Iniziale 80% fase A gradiente lineare in 30' fin al 40% di fase A

Rivelazione  $\lambda_{Ex} = 330 \text{ nm}$  -  $\lambda_{Em} = 465 \text{ nm}$

Volume di iniezione 10 µl

### Derivatizzazione post colonna

Flusso 0,3 ml/min

Temperatura cella di reazione 40°C

Reagente di derivatizzazione OPA (0,20 g/l in tampone borato pH 10)

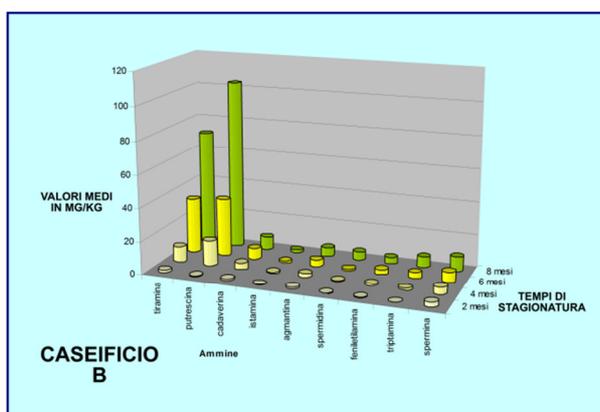
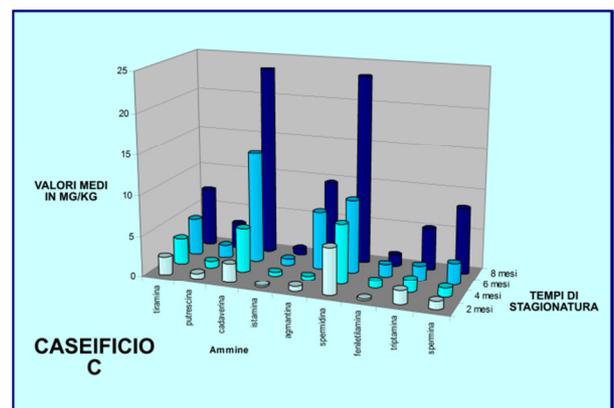
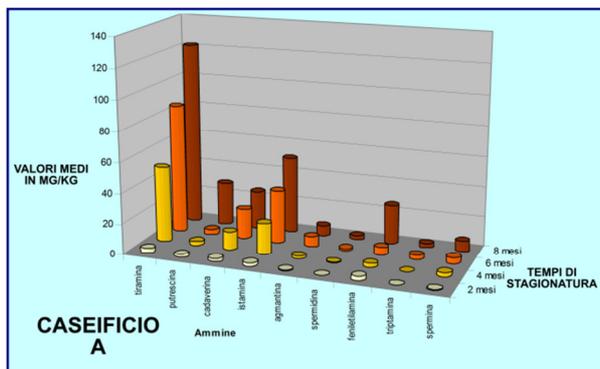
## RISULTATI

I risultati ottenuti sono illustrati nella tabella seguente

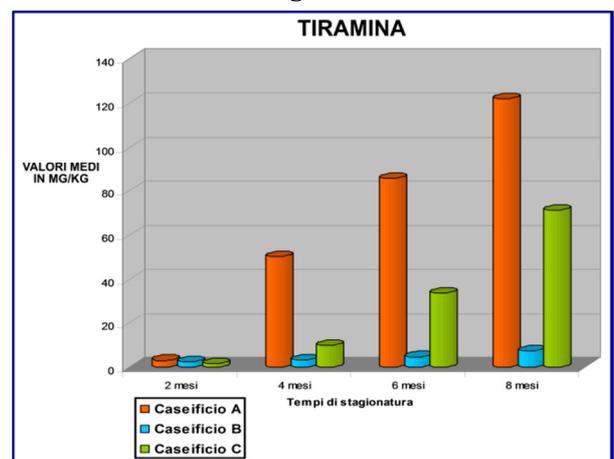
Tabella riepilogativa dati (mediane) in µg/g formaggio

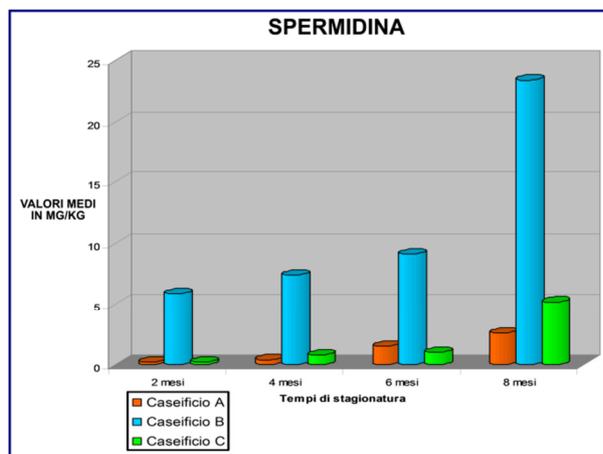
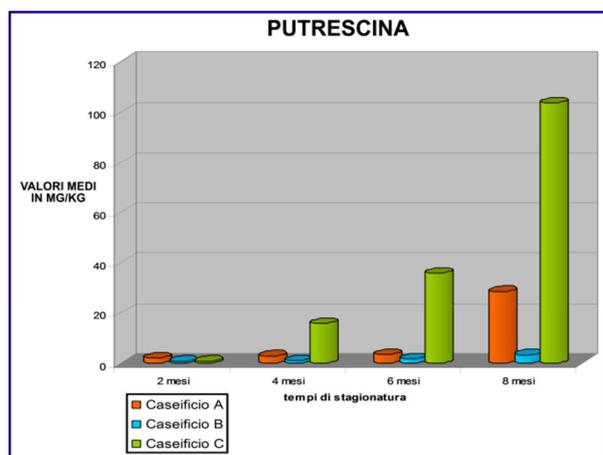
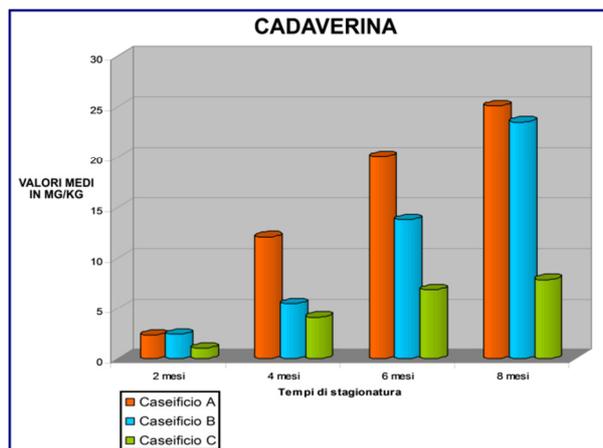
CASEIFICIO A									
	tiramina	putrescina	cadaverina	istamina	agmantina	spermidina	feniletilamina	triptamina	spermina
t1	2,9	1,6	2,0	2,1	0,6	0,2	2,0	0,3	0,5
t2	48,1	2,7	11,4	20,2	1,7	0,4	2,6	0,3	2,6
t3	84,7	3,5	20,5	34,6	7,1	1,5	4,7	2,7	4,1
t4	122,5	27,8	25,6	52,6	6,0	2,3	21,8	2,5	6,4
CASEIFICIO B									
	tiramina	putrescina	cadaverina	istamina	agmantina	spermidina	feniletilamina	triptamina	spermina
t1	2,1	0,8	2,4	0,2	0,6	5,7	0,2	1,3	0,8
t2	3,3	0,7	5,6	0,5	0,5	7,1	0,9	1,6	1,0
t3	4,7	1,4	13,8	0,9	6,3	9,5	1,3	1,3	1,6
t4	6,9	3,0	24,3	0,8	9,1	21,6	1,3	4,4	8,1
CASEIFICIO C									
	tiramina	putrescina	cadaverina	istamina	agmantina	spermidina	feniletilamina	triptamina	spermina
t1	1,7	0,7	1,0	0,3	1,0	0,2	0,5	0,2	2,4
t2	10,2	16,2	4,4	0,8	2,6	0,9	1,6	1,1	4,0
t3	30,6	28,9	7,0	1,1	4,2	1,1	3,3	3,5	6,1
t4	72,0	84,2	7,9	1,9	5,0	5,0	3,5	6,2	8,7

Nello specifico per i tre caseifici si sono ottenuti i seguenti valori:



Per il tre caseifici il movimento delle principali ammine ha offerto i seguenti risultati.





## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

In generale si nota un chiaro aumento dei titoli delle diverse ammine con il progredire dei tempi di maturazione. L'incremento è sostanzialmente lineare eccetto che per la spermidina che ha un incremento significativo dopo il sesto mese di stagionatura. Il caseificio B mostra in generale titoli assai inferiori rispetto agli altri due caseifici eccetto che per quanto riguarda la cadaverina e la spermidina. Mentre il caseificio A mostra titoli di tiramina nettamente più alti rispetto agli altri due impianti. Le differenze tra i tre caseifici si ipotizza siano ascrivibili al diverso uso di starter infatti per disciplinare gli starter utilizzati nella produzione del pecorino toscano sono autogeni e quindi differenti da caseificio a caseificio ed è innegabile che il tipo di flora che viene a determinarsi all'interno del prodotto condiziona il profilo amminico poiché la produzione delle AB è sostanzialmente legata ad attività enzimatiche di origine batterica. Non abbiamo elementi per sospettare influenze della materia prima poiché comunque tutti i prodotti derivavano dalla lavorazione di pool di latte raccolti da diversi allevatori mentre le condizioni di pastorizzazione erano simili in tutti i caseifici. Anche le condizioni di maturazione, essendo determinate dal disciplinare, non si ritiene abbiano elementi di diversità tali da condizionare il profilo enzimatico del prodotto in maniera tale da determinare sostanziali diversità nella produzione di ammine. Comunque i risultati ottenuti confrontati con dati di letteratura relativi ad altri formaggi mostrano livelli nettamente inferiori.

Formaggio	Mesi stagionatura	Tyr	His	Put	Cad	Trp	Spe	Spd	Fen
		ppm							
Dop Toscano	8	122	50	104	25	7	9	23	26
Castelmagno		1009	646		310	1048	449	0,40	
Raschera		154	452		119	389	352	11	
Toma Piemontese		282	587		1	255	194	6	
Robiola Roccaverano		2067	1786						
Provola dei Nebrodi	1,5	38	20	15	15				22
Feta	4	246	84	193	83	6			5
Cabrales	3	1135							
Olandese	6	392	59	132					
Svizzero	5	320							

In conclusione possiamo affermare che se i dati sperimentali evidenziano come il processo di maturazione conduca ad un aumento apprezzabile delle ammine a seguito delle attività proteolitiche e decarbossilasiche che s'istaurano all'interno del prodotto per effetto degli enzimi principalmente di origine batterica nel pecorino toscano la presenza delle AB non costituisce un pericolo con livello di rischio significativo. Infatti in considerazione che il consumo medio di pecorino stagionato, ipotizzato che tutta la produzione sia consumata localmente, non eccede i 250 grammi /capo /anno mentre una porzione ragionevole la possiamo considerare intono agli 80/100 grammi. Per tanto considerati i livelli di ammine accertati nella nostra ricerca possiamo affermare che per persone in normali condizioni di salute dedite ad una alimentazione normale non esista un rischio relativo alle ammine assunte con consumo di pecorino toscano DOP. Rimane il fatto che soggetti che assumono farmaci o che ingeriscono grandi quantità di formaggio possano accusare sintomatologia riferibile ad intossicazioni da ammine in particolare da tirammina .

## BIBLIOGRAFIA

1. Mayer HK, Fiechter G, Fischer E. (2009). A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *J Chromatogr A*. Sep 13
2. Schievano E, Guardini K, Mammi S.. (2009). Fast determination of histamine in cheese by nuclear magnetic resonance (NMR). *J Agric Food Chem*. Apr 8;57(7):2647-52.
3. Marino M, Maifreni M, Bartolomeoli I, Rondinini G. (2008). Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *J Appl Microbiol*. 2 Aug;105(2):540-9.
4. Bonetta S, Bonetta S, Carraro E, Coisson JD, Travaglia F, Arlorio M. (2008). Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese. *J Food Prot*. Jan;71(1):205-9.
5. Burdychova R, Komprda T.(2007) Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol Lett*. Nov;276(2):149-55
6. P. F. Fox, T.M. Cogan, (2000). *Fundamentals of cheese science*
7. O. Salvadori del Prato (2001). *Trattato di tecnologia casearia*
8. W. M. Dąbrowski, Z. E. Sikorski (2005). *Toxins in foods*