

CONTENUTO DI AMINE BIOGENE NEL “PECORINO DEL PARCO DI MIGLIARINO-SAN ROSSORE”

BIOGENIC AMINE CONTENT IN “PECORINO DEL PARCO DI MIGLIARINO - SAN ROSSORE”

Forzale F.¹, Giorgi M.², Pedonese F.¹, Nuvoloni R.¹, D’Ascenzi C.¹, Rindi S.¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa

²Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa.

SUMMARY

Biogenic amines (BAs) can be naturally present in several foods. They are mainly produced in large amounts by amino acid decarboxylases activity of bacteria. The BAs content has been associated to the quality of raw material and to fermentation or spoilage processes. The aim of the present study was to assess the content of BAs (single and total value) in the core and in the external part of a Tuscan traditional pecorino cheese. Sixteen “Pecorino del Parco di Migliarino-San Rossore” cheeses belonging to same batch were tested during ripening time, up to 5 months. BAs content was analyzed by an HPLC-UV method. The BAs content was significantly higher in the core than in the external part. Tyramine was the amine most frequently detected and largely quantized, followed by putrescine, histamine and cadaverine.

KEYWORDS

biogenic amines, food safety, traditional cheeses, “Pecorino del Parco di Migliarino-San Rossore”, ripening time

INTRODUZIONE

Il “Pecorino del Parco di Migliarino-San Rossore”, inserito nell’elenco regionale dei prodotti tradizionali (1), è un formaggio prodotto in Toscana nell’area del Parco Regionale omonimo che coinvolge le province di Pisa e Lucca. Tale formaggio, di seguito indicato come “Pecorino del Parco”, viene fabbricato impiegando latte proveniente da ovini di razze autoctone, in particolare la Massese, allevati nel territorio del Parco secondo le regole della pastorizia tradizionale. Il processo produttivo, che fa riferimento a tecniche e strumenti tradizionali, è rimasto invariato negli anni e la selezione delle razze, la cura nell’alimentazione del bestiame, basata su foraggi ricavati principalmente dai pascoli del Parco, l’usuale utilizzo di latte crudo e il processo di stagionatura su assi di legno conferiscono al “Pecorino del Parco” le caratteristiche peculiari. Il processo di produzione prevede l’utilizzo del latte crudo entro tempi il più possibile brevi dalla mungitura; l’eventuale termizzazione è a

discrezione del casaro. Al latte, portato ad una temperatura di circa 35°C, viene aggiunto il caglio di vitello o, nella tipologia più tradizionale, di agnello in pasta. Il tempo di formazione della cagliata è compreso tra 40 e 60 minuti. Successivamente viene praticata la rottura della cagliata, la cui entità è determinata in base al grado di stagionatura desiderato. È previsto tradizionalmente un secondo riscaldamento della pasta a circa 42°C, dopo la rottura della cagliata. Segue la fase di messa in forma e di accurata pressatura della pasta. Dopo la salatura a secco, per la stagionatura il formaggio viene posto su assi di legno all’interno di celle a temperatura e umidità controllate per un periodo variabile tra i tre e i cinque mesi, anche se tradizionalmente si produce pure un formaggio a più breve maturazione. Di fatto la produzione attuale si concentra presso un unico caseificio, anche se esiste una piccola produzione saltuaria presso singoli allevatori.

Per questo formaggio tradizionale, commercializzato sia a livello locale sia al di

fuori dei confini regionali, già studiato per quanto riguarda l'evoluzione del profilo microbiologico e la caratterizzazione delle microflora lattiche autoctone (2), non esistono dati riguardo alla quantità ed al tipo di amine biogene (AB) presenti.

Le AB sono composti azotati che derivano principalmente dalla decarbossilazione microbica degli aminoacidi o dall'aminazione e transaminazione di aldeidi e chetoni (3). Sono basi organiche a basso peso molecolare, originate dal metabolismo microbico, vegetale e animale. Istamina (HIS), tiramina (TYR), 2-fenilettilamina (2-PHEN), cadaverina (CAD), putrescina (PUT), triptamina (TPT), spermidina (SPD) e spermina (SPR) sono le AB più frequentemente riscontrate, in differenti quantità, in molti formaggi, salumi e in altri alimenti fermentati (3, 4, 5, 6). Alti livelli di AB sono spesso associati a prodotti fermentati ad alto contenuto proteico, fra cui i formaggi, oltre che a prodotti conservati a lungo o non correttamente; in particolare HIS e TYR, se presenti in ingenti quantità, provocano tossicità. Le più importanti sindromi di origine alimentare causate da AB sono la cosiddetta "sindrome sgombroide", riconducibile ad intossicazione da HIS, e la "sindrome del formaggio", legata alla presenza di alti livelli di TYR in questo tipo di prodotti. Il rischio legato alla presenza di AB dipende, oltre che dal tipo di amina considerata, anche da altri fattori, quali la sua quantità e l'efficienza dei meccanismi di detossificazione presenti nell'organismo (3).

Scopo di questo lavoro è stato di quantificare il contenuto di AB nel "Pecorino del Parco" considerando separatamente la parte interna ed esterna, per valutare eventuali differenze.

MATERIALI E METODI

La valutazione del contenuto di AB è stata effettuata su formaggi pecorini a latte crudo "Pecorino del Parco" prodotti presso un caseificio della provincia di Pisa. Nella ricerca sono stati considerati i formaggi di un intero lotto di produzione, con un peso di circa di 2 kg ciascuno; le analisi sono state effettuate a 0, 3, 10 giorni, e, a cadenza settimanale fino al terzo mese (91^{mo} giorno), poi al quarto (122^{mo} giorno) e al quinto mese (153^{mo} giorno). È stato valutato il contenuto di amine biogene sia nella zona più esterna (l'immediato sottocrosta), sia in quella interna. I campioni sono stati analizzati in doppio e, qualora la differenza tra i campioni fosse risultata superiore al 15%, le analisi sono state ripetute.

Prima di analizzare il contenuto di AB nei campioni di

formaggio, sono state determinate le curve di calibrazione aggiungendo a 10 g di matrice, concentrazioni note (0,1, 1, 10, 100, 500 µg/ml) di una miscela di AB e standard interno (S.I.) (1,7 diaminoeptano), preparate da soluzioni stock di 1000 µg/ml in acqua. I risultati ottenuti sono stati sottratti a quelli del campione analizzato con la medesima procedura, ma senza aggiunta di AB.

Per la quantificazione delle diverse AB è stata utilizzata la metodica HPLC-UV (7) parzialmente modificata. Ogni campione (10 g) è stato addizionato con 1 ml di S.I. (50 µg/ml) ed estratto due volte con 20 ml di HCl (0,1M). La soluzione acida è stata filtrata ed 1 ml della stessa è stata centrifugata per eliminare il grasso. Dopo aggiustamento del pH a 11,5, i campioni sono stati derivatizzati con dansil-cloruro (5 mg/ml) per 1 h a 40°C. Sono stati poi aggiunti 400 µl di prolina (100 mg/ml) ed i campioni, estratti due volte con 1 ml di etere-etilico. Il solvente organico è stato portato a secco sotto leggero flusso di N₂ a temperatura ambiente, ripreso con 1 ml di acetonitrile (ACN), filtrati ed iniettati in HPLC. Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio. Per le analisi è stato utilizzato un apparecchio HPLC-UV (Thermo Finnigan Italia, Milano) configurato secondo le seguenti condizioni analitiche: lunghezza d'onda 254 nm, loop 20 µl, flusso 0,8 ml/min, colonna Hypersil gold C18 (150 mm x 4,6 mm, 3µm) (Superchrom, Milano), fase mobile ACN/H₂O. Il programma di gradiente è stato il seguente: 65/35 v/v per 1 min, aumento all'80% (10 min), al 90% (12 min) ed al 100% (16 min) di ACN, con tenuta di tali condizioni fino al 23^{mo} minuto. Dopo ogni singola analisi è stata effettuata una corsa di lavaggio con metanolo e sono state ripristinate le condizioni di equilibrio di gradiente. La precisione intra ed inter-day e l'accuratezza sono state determinate dall'analisi di 3 replicati dei campioni a concentrazioni di LOQ (limite di quantificazione) basse, medie ed alte, durante un periodo di 7 giorni. LOQ e LOD (limite di determinazione) sono stati determinati come le concentrazioni di analita che hanno dato un rapporto segnale/rumore di fondo rispettivamente di 10 e 3.

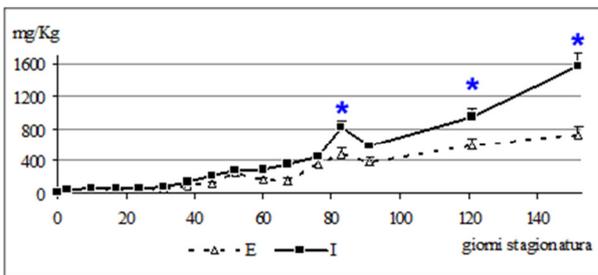
Per verificare se c'erano differenze statisticamente significative tra le medie, è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) dei dati ottenuti. Le differenze sono state considerate significative se associate ad un livello di probabilità inferiore a 0,05 (*).

RISULTATI

La metodica modificata ha fornito LOQ e LOD rispettivamente di 1 e 0,3 mg/kg. Il massimo

valore del coefficiente di variabilità % nell'analisi della precisione intra/inter-day è risultato del 6%. Nei grafici sono riportati il valore totale e quello delle singole amine maggiormente riscontrate, nella parte esterna (-Δ- E) ed interna (-■- I) dei formaggi testati, espressi in mg/kg sul prodotto tal quale. Per quanto riguarda il contenuto totale (Fig. 1), il trend è stato di costante crescita durante il periodo di stagionatura, attestandosi su valori di 591,92±65,11 mg/kg all'interno e 393,09±43,24 all'esterno, alla fine del terzo mese, che corrisponde al consueto periodo di stagionatura e quindi al momento della messa in vendita del formaggio.

Figura 1. Contenuto totale di AB durante il periodo di stagionatura

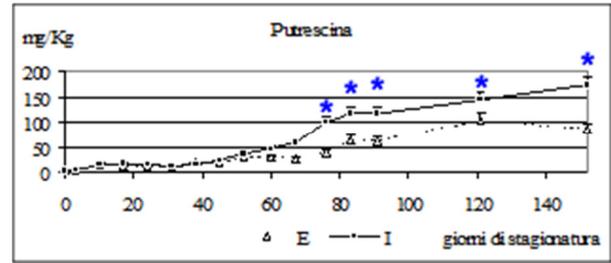
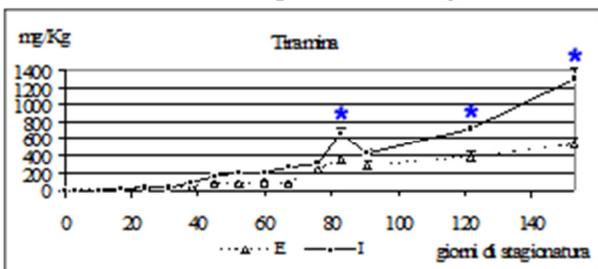


(-Δ-): zona esterna; (-■-): zona interna; (*): differenza significativa (p<0.05).

Al quarto mese e al quinto mese il contenuto totale si è attestato rispettivamente su valori di 958,16±86,23 mg/kg (parte interna) e 587,36±47,79 mg/kg (parte esterna) e di 1578,72±142,08 mg/kg (parte interna) e 721,81±80,51 mg/kg (parte esterna), rispettivamente.

Per quanto riguarda il contenuto singolo, le AB maggiormente riscontrate sono state TYR e PUT (Fig. 2-3), seguite, in quantità inferiori, da HIS e CAD, sia nella zona esterna sia in quella interna.

Figure 2-3. Contenuto di Tiramina e Putrescina durante il periodo di stagionatura

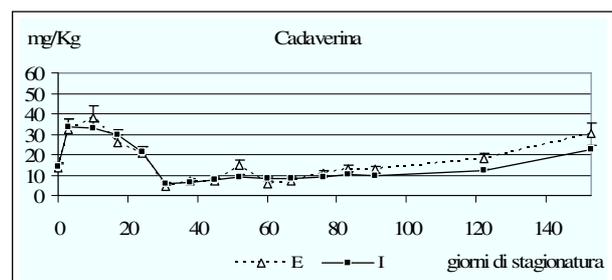
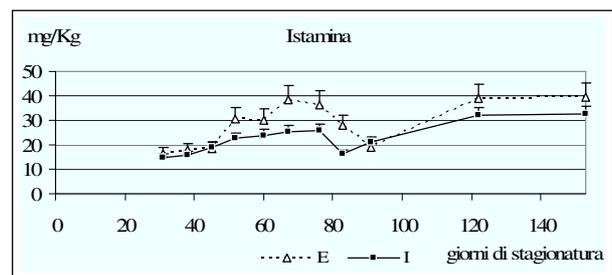


(-Δ-): zona esterna; (-■-): zona interna; (*): differenza significativa (p<0.05).

Il valore di TYR è stato significativamente più elevato all'interno rispetto all'esterno già dal 45^{mo} giorno (168,21±20,18 mg/kg contro i 79,49±10,33 mg/kg dell'esterno) fino all'ultimo campionamento, con valori pari a 1300,05±117,01 mg/kg nella parte interna e 527,85±58,06 mg/kg nella parte esterna. Anche nel caso di PUT il trend rivelato è stato crescente nel tempo, seppur quantitativamente inferiore rispetto a TYR, con differenze significative, tra parte interna ed esterna, a partire dal 76^{mo} giorno (99,2±10,9 mg/kg interno, 38,19±4,58 mg/kg esterno), fino a raggiungere valori di 172,95±15,56 mg/kg nella zona interna e 84,96±9,34 mg/kg nella zona esterna.

HIS e CAD (Fig. 4-5) sono state rilevate in concentrazioni molto più basse non superando mai la soglia dei 50 mg/kg. Nello specifico, HIS è stata rilevata dal 31^{mo} giorno in poi raggiungendo, al quinto mese, valori di 32,41±2,91 mg/kg nella parte interna e 39,45±5,44 mg/kg nella parte esterna.

Figure 4-5. Contenuto di Istamina e Cadaverina durante il periodo di stagionatura



(-Δ-): zona esterna; (-■-): zona interna; (*): differenza significativa (p<0.05).

La CAD ha seguito un andamento decrescente fino al primo mese, per poi subire un lieve ma costante aumento fino alla fine del quinto mese, con valori di $22,38 \pm 2,01$ mg/kg e $30,61 \pm 3,37$ mg/kg, nella zona interna ed esterna rispettivamente. HIS e CAD sono state le uniche amine testate il cui valore è risultato maggiore nella parte esterna rispetto all'interna, seppur in modo non statisticamente significativo.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L'analisi dei risultati ottenuti ha fornito un quadro generalmente rassicurante per quanto riguarda il contenuto totale di AB riscontrato al consueto periodo di stagionatura del formaggio (tre mesi), attestandosi sotto la soglia di tossicità (1000 mg/Kg) (3). Differente il quadro riscontrato nei campionamenti successivi, al quarto e quinto mese, dove, come si evince dal grafico, la concentrazione è aumentata sino a raggiungere valori più elevati, che in alcune categorie più sensibili di consumatori, potrebbero costituire un potenziale rischio per la salute. Nei formaggi a latte crudo, come nel caso del "Pecorino del Parco" preso in esame, il riscontro di un valore totale di AB elevato potrebbe essere riconducibile all'assenza di trattamenti termici del latte, in grado di determinare un incremento delle microflora, che possono comprendere numerose categorie microbiche decarbossilasi positive (3, 6) come, per altro, già riscontrato in un precedente studio sui prodotti tradizionali toscani (8). A conferma di ciò, il profilo microbico del "Pecorino del Parco" ha evidenziato la presenza, fino alle fasi finali di maturazione, di microflora autoctone come lattobacilli mesofili ed enterococchi (2), per i quali sono note le possibili attività decarbossilanti.

Nel formaggio in esame, il profilo analitico ha evidenziato che la TYR rappresenta l'amina maggiormente individuata (per diffusione e quantità) per tutto il periodo di campionamento, seguita da PUT, HIS e CAD, come riscontrato da altri autori in altre tipologie di formaggi (3, 4, 6). È importante sottolineare che la presenza di TYR in quantità considerevoli (100-800 mg/Kg), può costituire un potenziale pericolo per il consumatore, mentre in quantità minori, questa AB può potenziare l'azione di HIS, inibendone i meccanismi di detossificazione (4). Nel "Pecorino del Parco" preso in esame, i livelli di HIS sono sempre risultati contenuti, al contrario di quanto rilevato da alcuni autori in altri formaggi italiani (9, 10). Per quanto

riguarda 2-PHEN, TPT, SPD e SPR, sono risultate presenti in quantità minime; tuttavia è opportuno ricordare che tali AB possono fungere da "potenziatori" della tossicità di altre AB, aumentandone gli effetti, inibendo direttamente gli enzimi deputati alla loro inattivazione (MAO, DAO, HMT) e/o ostacolandone l'ossidazione (11).

Per quanto riguarda la maggior presenza di AB nella parte centrale del formaggio rispetto a quella esterna, questa può essere verosimilmente dovuta al fatto che in questa localizzazione esistono condizioni più adatte (activity water e concentrazione salina) per la proliferazione della maggior parte delle microflora decarbossilasi-positivo (11).

In conclusione il "Pecorino del Parco", pur avendo fornito nell'insieme risultati rassicuranti riguardo al contenuto di AB, necessita di ulteriori approfondimenti riguardo all'accumulo delle stesse qualora il tempo di stagionatura venga prolungato oltre il normale periodo di 3 mesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Delibera della Giunta Regionale N. 496 del 05 aprile 2005 relativa all'approvazione dell'aggiornamento dell'elenco dei prodotti tradizionali toscani per l'anno 2005.
2. Pedonese F., Innocenti E., Nuvoloni R., D'Ascenzi C., Giraffa G., Neviani E., Rindi S., Cerri D., (2002). Caratterizzazione delle microflora autoctone del formaggio tradizionale ovino prodotto nel "Parco Regionale Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli". *Scienza e Tecnica lattiero-casearia* 53, 213-234.
3. Silla Santos M.H., (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 29, 213-231.
4. Stratton J.E., Hutkins R.W., Taylor S.L., (1991). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Journal of Food Protection* 54, 460-470.
5. Moret S., Smela D., Populin T., Conte L.S., (2005). A survey on free biogenic content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry* 89, 355-361.
6. Önal A., (2007). A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* 103, 1475-1486.
7. Innocente N., Biasutti M., Padovese M., Moret S., (2007). Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry* 101, 1285-1289.

8. Forzale F., Giorgi M., Pedonese F., Nuvoloni R., D'Ascenzi C., Rindi S., (2009). Valutazione del contenuto di amine biogene in prodotti di origine animale tradizionali toscani. Atti LXIII Convegno Società Italiana Scienze Veterinarie, 365-367. Udine.
9. 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. *Journal of Food Protection* 71, 205-209.
10. ten Brink B., Damink C., Joosten H., Huis in't Veld J.H.J., (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11, 73-84.
11. Mercogliano R., Cortesi M.L., (2008). Presenza di amine biogene negli alimenti di origine animale. *Industrie Alimentari* 12, 43-50.