

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE E ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI
Sezione di Ispezione

DOTTORATO DI RICERCA IN PRODUZIONE E SANITA' DEGLI
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE (XX CICLO).

TESI DI DOTTORATO

**STUDIO DEL PROFILO AMMINICO IN
PRODOTTI INNOVATIVI A BASE DI
THUNNUS THYNNUS**

Coordinatore:
Ch.ma Prof. ssa
Maria Luisa Cortesi

Candidato:
Rosa D'Ambrosio

Relatore:
Ch.ma Prof. ssa
Maria Luisa Cortesi

ANNI ACCADEMICI 2004/2007

RIASSUNTO - Scopo della ricerca è stato quello di valutare il profilo delle ammine biogene e di istamina in prodotti innovativi a base di *Thunnus thynnus*. La produzione di ammine biogene è legata alla decarbossilazione di amminoacidi liberi ad opera della flora endogena ed esogena decarbossilasi positiva presente negli alimenti. Il profilo amminico è stato determinato in prodotti crudi e cotti a base di tonno. Le ammine, estratte in acido perclorico, sono state incubate con dansyl chloride e separate mediante un sistema HPLC associato a un rivelatore spettrofluorimetrico. Relativamente all'istamina il profilo amminico ha indicato livelli sempre inferiori al limite normativo sia nei prodotti crudi, sia in quelli cotti. Una riduzione dei livelli di questa ammina nei prodotti cotti si è osservata quando alla carne, sezionata in pezzi più piccoli, sono stati aggiunti polifosfati e una maggiore percentuale di salamoia.

Parole chiave : **Ammine biogene, prodotti a base di *Thunnus thynnus***

ABSTRACT

The aim of these study was to determine the biogenic amine profile and histamine levels in *Thunnus thynnus* innovative processed seafoods. Biogenic amine formation is due to the decarboxylation of free amino acids by endogenous and exogenous decarboxylases released by amine-producing bacteria. Biogenic amines and histamine levels were determined in *Thunnus thynnus* raw and cooked processed seafoods. The amines were extracted from fish with perchloric acid, reacted with dansyl chloride and separated in a HPLC/FL system. In particular histamine levels were always lower than the law limits both in the raw and the cooked products. A reduction of the histamine levels in cooked products was observed when polyphosphates and a higher percentage of pickle were used and the meat was reduced into smaller pieces..

KEYWORD : **Biogenic amines, *Thunnus thynnus* processed sea foods**

INDICE

CAPITOLO I

1.1 Ammine biogene e naturali

1.2 Sintesi e metabolismo delle ammine biogene

1.3 Azioni biologiche

CAPITOLO II

2.1. Tossicità delle ammine biologicamente attive

2.2. Presenza di ammine biogene negli alimenti di origine animale

CAPITOLO III

3.1 Thunnus Thynnus : caratteristiche anatomiche e modalità di pesca

3.2 Prodotti a base di tonno

CAPITOLO IV Materiali e metodi

CAPITOLO V Risultati

CAPITOLO VI Conclusioni e considerazioni

Bibliografia

CAPITOLO I

1.1 Ammine biogene e naturali

Le ammine sono basi organiche a basso peso molecolare presenti in animali, piante o microrganismi come conseguenza dei loro processi metabolici **(1,2)**. Negli alimenti, pertanto, esse possono essere naturalmente presenti (*naturali*) o prodotte per decarbossilazione di amminoacidi ad opera di enzimi di origine microbica (*biogene*).

Le ammine presenti nella dieta, in base alla loro struttura chimica, possono anche essere classificate come:

- monoammine (tiramina, feniletilamina)
- diammine (istamina, serotonina, putrescina, cadaverina)
- poliammine (spermidina, spermina e agmatina) **(3,4)**

Tali ammine sono definite *primarie* per la presenza di un solo gruppo organico legato all'atomo di azoto. Il gruppo organico può essere

alchilico, arilico o ad anello, per cui si dividono in *alifatiche* (putrescina, cadaverina, agmatina, spermina, spermidina), *aromatiche* (tiramina, feniletilamina) ed *eterocicliche* (istamina, serotonina).

Ammine naturali sono presenti nei vegetali in concentrazioni moderate e generalmente prive di significato tossicologico per la salute del consumatore, anche se esistono delle eccezioni: il lampone può contenere tiramina fino a 90 mg/Kg, nella banana la concentrazione di serotonina è di 30-40 mg/Kg, mentre nell'ananas immaturo il contenuto dell'ammina è pari a 60 mg/Kg e tende a ridursi a tracce quando il frutto raggiunge la maturazione. Molti succhi e nettari di frutta ottenuti da arance, limoni, uva e fragole contengono ammine (principalmente putrescina) in concentrazioni variabili (5).

Anche in altre tipologie di alimenti le ammine naturali sono abitualmente presenti, ad esempio in alcune specie di funghi, nei semi

di cacao e quindi nel cioccolato si riscontra la presenza di elevate concentrazioni di 2-feniletilamina(6).

In tutti gli alimenti contenenti proteine o amminoacidi liberi che permettano lo sviluppo e l'attività biochimica dei microrganismi è, invece, possibile rilevare quantitativi variabili di ammine biogene (AB). La quantità totale di AB che si formano dipende essenzialmente dalla natura dell'alimento e dai microrganismi presenti (7).

Una crescente attenzione è riservata ad alcune AB in relazione al fatto che, per le loro spiccate proprietà vasoattive e neuroattive, possono costituire un potenziale rischio per la sicurezza dei consumatori, soprattutto in presenza di fattori inibenti il sistema enzimatico di detossificazione delle mono e diamino-ossidasi, cui spetta il ruolo di degradazione di queste molecole. La complessità delle reazioni in cui le AB sono coinvolte rende difficile l'individuazione di una soglia di

tossicità, che dipende, in ultima analisi, dall'efficienza dei sistemi di detossificazione che muta in relazione a variabili individuali e fisiologiche.

Le più importanti sindromi di origine alimentare causate dall'ingestione di alimenti contenenti questi composti sono l'intossicazione da istamina presente in alcune famiglie di pesci o "Scombroid syndrome" e l'intossicazione da tiramina, cosiddetta "Cheese syndrome", documentate in numerosi studi epidemiologici (8-11).

Tuttavia anche quando la loro concentrazione ematica non raggiunge livelli considerati tossici, la sola presenza di AB può costituire un rischio per la possibile formazione di nitrosammine, potenti oncogeni che si formano per reazione tra acido nitroso e ammine secondarie in ambiente acido. Tale reazione può avvenire in vivo favorita dal pH

gastrico, ma è possibile anche attraverso l'assunzione di nitrosammine preformate negli alimenti. In alcuni casi, infatti, durante il processo produttivo si possono creare condizioni ambientali idonee alla formazione di precursori di nitrosammine o anche la formazione delle medesime (12).

Per il potenziale rischio sanitario che possono costituire per il consumatore, le AB rappresentano, quindi, importanti indicatori di qualità degli alimenti di origine animale. Per alcune derrate la loro presenza può, infatti, essere correlata alla qualità igienica delle materie prime e allo stato di freschezza; in altri casi ancora le loro concentrazioni negli alimenti esprimono il rapporto causa-effetto relativo ad improprie condizioni di produzione e/o conservazione.

1.2 Sintesi e metabolismo delle ammine biogene

Si ritiene che la sintesi di AB da parte dei batteri abbia una ragione energetica. Rappresenterebbe un meccanismo secondario di produzione di energia, che entra in gioco in condizioni di difficoltà nutrizionale, in cui per i batteri non sarebbe possibile mettere in atto processi metabolici a più alta resa energetica.

Di regola nelle cellule il potenziale per generare un gradiente ionico elettrochimico di membrana risiede nella permeabilità limitata della membrana citoplasmatica. Il gradiente ionico elettrochimico energeticamente più importante è quello protonico (13), azionato da specifiche pompe che formano un gradiente protonico elettrochimico.

Nei batteri aerobi la catena respiratoria rappresenta la pompa protonica, che realizza un trasferimento di elettroni nella catena

respiratoria con espulsione di protoni dal citoplasma verso l'esterno

della cellula. Come risultato determina la formazione di due gradienti:

a) un gradiente di pH, alcalino all'interno e acido all'esterno, grazie

alla rimozione dalla cellula dei protoni e al loro accumulo nel mezzo

esterno;

b) un potenziale di membrana, attraverso la traslocazione di cariche

positive (protoni) dall'interno verso l'esterno della cellula.

La somma dei due gradienti è la forza proton-motrice (FPM), che

guida il flusso di protoni e ha come risultato rilascio di energia.

Spesso i microrganismi nell'ambiente di crescita attraversano fasi di

abbondanza nutrizionale, alternati a condizioni di carenza e stress.

Quando le risorse energetiche si esauriscono, decresce rapidamente il

tasso di glicolisi e con esso la generazione della FPM. In tale

condizione batteri decarbossilasi-positivi per crescere e moltiplicarsi

assorbono precursori (es. ammine), che metabolizzati a livello intracellulare ed espulsi come prodotti finali, generano energia nello scambio precursore/prodotto finale.

Un esempio di tale meccanismo energetico è la formazione di istamina (IST) ad opera dell'attività enzimatica di *Lactobacillus buchneri* produttore di AB. L'assorbimento intracellulare di istidina neutra avviene mediante un trasportatore che, dopo decarbossilazione dell'amminoacido, espelle l'istamina unitamente ad una carica positiva. La fuoriuscita di una carica positiva dall'interno all'esterno della membrana cellulare e la formazione di un potenziale di membrana rende lo scambio istidina/IST un processo elettrogenico, che genera la FPM e consente la conservazione dell'energia metabolica del batterio (Fig.1)

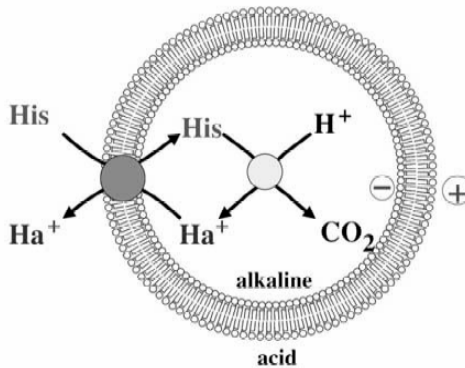


Fig. 1 – conservazione dell’energia metabolica in *Lactobacillus buchneri* mediante scambio istidina/IST dopo decarbossilazione (14) *

Dal punto di vista metabolico la principale modalità di sintesi della AB è rappresentata, quindi, dalla decarbossilazione batterica a partire da amminoacidi liberi. In particolare (7,8) per la formazione di AB sono condizioni necessarie :

- presenza di batteri decarbossilasi-positivi
- disponibilità di amminoacidi liberi
- condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo microbico, alla sintesi e all’attività decarbossilasica.

***Il medesimo processo è riscontrabile nella formazione di altre AB**

Le decarbossilasi fanno parte del corredo enzimatico di molte specie batteriche in grado di decarbossilare uno o più amminoacidi, mentre la distribuzione di una flora, caratteristica per ogni tipologia di alimento, condiziona la maggiore o minore presenza nei prodotti di alcune ammine rispetto ad altre. Decarbossilasi sono presenti in *Bacillus* (15), *Pseudomonas* (10), *Photobacterium* (16,17), in diversi generi della famiglia Enterobacteriaceae (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*) (12,18,19) e delle Micrococcaceae (*Staphylococcus*, *Micrococcus*) (15,20).

Le Enterobacteriaceae presentano elevate attitudini decarbossilasiche, soprattutto per quanto concerne la produzione di cadaverina (CAD) e putrescina (PUT). Sono anche responsabili della formazione di elevate quote di istamina (IST), prodotta in discrete quantità particolarmente da *Eb. cloacae*, *Eb. aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* (18) e da *E.coli*

(21) e *Morganella (Proteus) morganii* (22). Un non corretto stoccaggio delle materie prime oppure fermentazioni non controllate possono essere causa di proliferazioni di Enterobacteriaceae e di un conseguente rilascio nel mezzo di decarbossilasi già nelle prime fasi della fermentazione. Gli enzimi liberati nel mezzo possono così essere responsabili dell'accumulo di AB, anche in assenza di cellule microbiche vitali (23).

L'attività decarbossilasica è stata riscontrata non solo in microrganismi appartenenti alla microflora alterante, ma anche in quelli appartenenti alla microflora utile in alimenti fermentati e stagionati come, ad esempio, nei batteri lattici (22, 24, 25, 26), in *Micrococcus*, in *Staphylococcus xylosus* (10) e nei lieviti (26).

Tra i batteri lattici (LAB), agenti di fermentazioni alimentari generalmente considerati sicuri dal punto di vista igienico- sanitario, alcune specie sono maggiormente coinvolte nella genesi di AB.

Ceppi di lattococchi, pediococchi, streptococchi (*Streptococcus thermophilus*) e Leuconostoc, compreso *Oenococcus oeni*, sono stati indicati come potenziali agenti decarbossilanti (24). Ceppi appartenenti alle specie *L. buchneri*, *L. alimentarius*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. farciminosus*, *L. bavaricus*, *L. homohiochii*, *L. reuteri* e *L. sakei* possono essere considerati produttori di ammine (in particolare di tiratina) (22, 25, 26). In *Micrococcus* e *Staphylococcus xylosus* è stata osservata, invece, una più spiccata tendenza a produrre istamina(10).

Esistono limitati dati in letteratura concernenti il contributo dei lieviti alla sintesi di AB negli alimenti fermentati, ma è noto che lieviti isolati da carni fermentate ed appartenenti ai generi *Debaryomyces* e

Candida presentano attività decarbossilasica istamino-produttrice maggiore di quella riscontrata in LAB e stafilococchi. Inoltre lieviti non identificati sono in grado di sintetizzare elevate quantità di feniletilamina e tiramina **(26)**.

Requisito fondamentale per la produzione di AB è la disponibilità di amminoacidi precursori **(9)**, presenti nell'alimento in forma libera oppure liberati in seguito alla proteolisi di peptici ad opera di enzimi autoctoni/ microbici.

L'attività decarbossilasica, oltre che dalla disponibilità di precursori, è influenzata anche dalla presenza di permeasi, che trasportino l'amminoacido precursore nel citoplasma per la decarbossilazione, di un cofattore (piridossalfosfato o vitamina B6) **(12)** e di valori di pH ottimali per la decarbossilazione compresi tra 5.0 e 6.5, in relazione al tipo di decarbossilasi **(11)**.

La temperatura ottimale per l'attività enzimatica è compresa tra 20° e 35° C, infatti a bassa temperatura l'attività è notevolmente ridotta (**10, 27**). Le AB sono termostabili, ad eccezione della SPM (**28**), ma alcune decarbossilasi rimangono attive anche dopo la pastorizzazione. Dunque negli alimenti trattati termicamente non solo non è assicurata la distruzione di ammine, ma è possibile un aumento dei livelli durante le fasi di maturazione e stoccaggio.

Viceversa elevate concentrazioni di NaCl (5-8%) e la presenza di ossigeno inibiscono l'amino-biogenesi, ostacolando lo sviluppo batterico (**29**), mentre condizioni di anaerobiosi in alimenti fermentati sembrano, invece, favorire la sintesi dei composti (**30,31**).

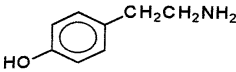
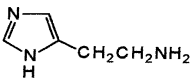
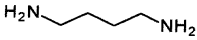

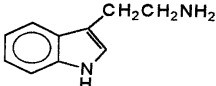
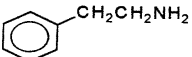
La conservazione rappresenta un vero e proprio punto critico nella formazione delle AB sia in relazione alla temperatura che alla durata dello stoccaggio (**32**). La miglior misura di prevenzione sembra

essere rappresentata dalla conservazione degli alimenti a basse temperature.

Negli alimenti fermentati è consigliabile l'uso di fermenti selezionati , capaci di portare a termine la fermentazione nel più breve tempo possibile.

Riguardo al meccanismo di sintesi la decarbossilazione amminoacidica prende il via dalla rimozione del gruppo α -carbossilico per dare origine alla corrispondente ammina. Istidina, tirosina, triptofano, lisina, fenilalanina e ornitina sono rispettivamente gli amminoacidi precursori delle ammine istamina, tiramina, triptamina, cadaverina, feniletilamina e putrescina (tab. 1).

L'agmatina può essere prodotta attraverso il metabolismo dell'arginina, così come le poliammine, spermina e spermidina (33).

<i>Amina biogena</i>	<i>Amminoacido precursore</i>
 tiramina	tirosina
 istamina	istidina
 putrescina	ornitina
 cadaverina	lisina
 triptamina	triptofano
 β-feniletilammina	fenilalanina

Tab.1 Ammine biogene e amminoacidi precursori

Sono stati identificati due meccanismi d'azione mediante i quali si verifica la decarbossilazione amminoacidica (34):

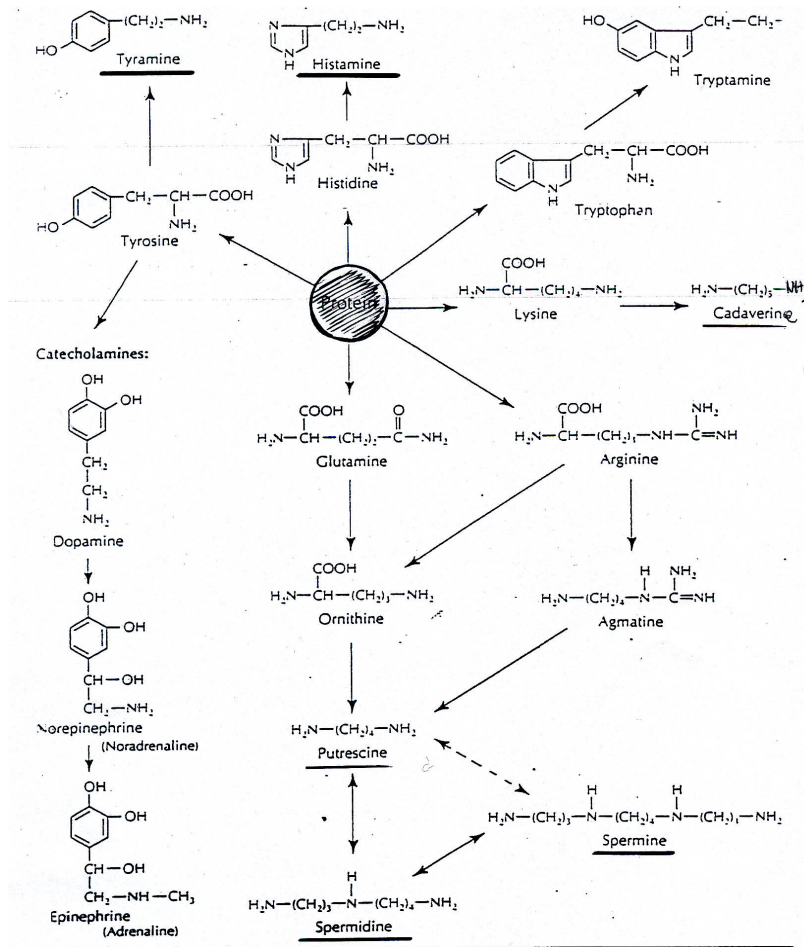
a) una reazione piridossal-fosfato dipendente, nella quale il piridossal-fosfato (PPH) catalizza reazioni amminoacidiche di enzimi piridossal-dipendenti e rappresenta, quindi, la parte della molecola enzimatica direttamente implicata nella reazione.

Mediante questa modalità il PPH reagisce con un amminoacido (A) per formare, come composto intermedio, una base di Schiff che, decarbossilata con eliminazione di una molecola di acqua, dà origine alla corrispondente ammina liberando il piridossal-fosfato secondo lo schema:



b) una decarbossilazione non piridossalfosfato-dipendente, in cui è coinvolto come proenzima attivo un gruppo piruvico, che si lega

covalentemente al gruppo amminico dell'amminoacido e catalizza la reazione di decarbossilazione formando l'ammina corrispondente.



Metabolic pathways for the formation of biogenic amines.

La sintesi di poliammine è un processo più complesso, anche se analogamente a quanto avviene nelle AB, la sua prima tappa prevede reazioni di decarbossilazione (1).

Il catabolismo delle AB avviene prevalentemente a livello intestinale e prevede reazioni ossidative catalizzate dai sistemi enzimatici mono- (MAO) e diammino-ossidasi (DAO) (7) , mentre quello delle poliammine si attua mediante reazioni di acetilazione e/o ossidazione mediate dai sistemi enzimatici poliammino-ossidasi (PAO) (1).

1.3 Azioni biologiche

Le AB sono composti stabili, capaci di resistere al calore e sopravvivere in condizioni acide o alcaline, posseggono cariche positive disposte lungo tutta la catena idrocarbonica e possono formare legami con molecole cariche negativamente.

Sia che derivino dalla dieta , sia che siano biosintetizzate, le loro funzioni biologiche e le implicazioni sui possibili effetti tossici sono diverse in relazione alle singole ammine.

PUT e le poliammine, SPM e SPD, sono coinvolte in alcune fasi della sintesi del DNA e dell'RNA. Infatti grazie alle loro caratteristiche strutturali promuovono l'inizio ed il controllo della traduzione del mRNA nella sintesi proteica, regolando anche la fedeltà della traduzione. Inoltre possono stimolare l'associazione delle subunità ribosomiali, stabilizzare la struttura del tRNA e ridurre la quota di degradazione dell'RNA.

Anche le poliammine incrementano la sintesi di DNA e RNA, modificano con legami covalenti le proteine e regolano stabilità e rigidità delle membrane cellulari, ma il ruolo metabolico fondamentale è di agire come secondo messaggero mediando l'azione degli ormoni e dei fattori della crescita (1). Esse sono indispensabili per garantire la funzione intestinale e favorirne il sistema immunitario.

Organi caratterizzati da un elevato turnover cellulare, come pancreas e

milza, sono particolarmente dipendenti dall'introduzione di poliammine attraverso la dieta (37). Inoltre SPM, SPD (con più gruppi amminici) e PUT (con due gruppi amminici) mostrano azione antiossidante inibendo l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi (38) e tale effetto è legato al numero di gruppi amminici presenti.

A causa della diversità dei ruoli svolti nel metabolismo e nella crescita cellulare, la richiesta di poliammine è particolarmente elevata nei tessuti a rapido accrescimento di tipo patologico come quelli tumorali, nei quali la loro azione è stata ampiamente studiata. In particolare, nello studio di terapie antitumorali, l'inibizione della biosintesi di poliammine è considerata il principale target della risposta individuale alla patologia. Per ridurre la crescita tumorale, una nuova direzione seguita dalla ricerca sul cancro è rappresentata dall'ipotesi di agire limitando l'immissione delle poliammine nel tessuto o favorendone la

ripartizione verso destinazioni differenti, allontanandole dal tessuto tumorale (35, 36).

Per quanto riguarda mono- e diammine, esse giocano una varietà di ruoli fisiologici, quali regolazione della temperatura corporea, del volume dello stomaco, del pH , inoltre possono modulare l'attività cerebrale.

Tra le AB l'istamina si caratterizza per la potente attività biologica.

Sebbene presente in grandi quantità sotto forma di granuli all'interno delle mastzellen e dei basofili ematici, i suoi effetti non si manifestano se conseguito alla sua liberazione in condizioni particolari come le reazioni allergiche, nelle quali è rilasciata in circolo. I suoi recettori di membrana sono localizzati a livello cardiaco e in alcune ghiandole secretorie, legandosi ai recettori induce nell'organismo diversi effetti:

1. agisce sull'attività cardiaca mediante liberazione di adrenalina e noradrenalina;
2. eccita la muscolatura liscia dell'utero, dell'intestino e dell'apparato respiratorio;
3. eccita i neuroni sensori e motori e controlla la secrezione acida gastrica (27,39).

Secondo alcuni autori (40) anche la tiramina avrebbe effetto antiossidante, legato alla presenza di un gruppo idrossilico, che aumenterebbe in modo proporzionale alle sue concentrazioni.

CAPITOLO II

1.2. Tossicità delle ammine biologicamente attive

Le ammine sono considerate composti mutageni/oncogeni, poiché o possono agire da precursori di composti capaci di formare N-nitrosammine, o essere direttamente nitrosate in N-nitrosammine, composti ritenuti potenzialmente oncogeni in diverse specie animali e nell'uomo. L'esposizione umana è legata, infatti, oltre che all'ingestione di nitrosammine preformate, anche alla nitrosazione *in vivo*, a livello gastrico in presenza di nitriti, a 37°C e pH 1-2, di ammine introdotte attraverso la dieta.

Alimenti sottoposti a trattamenti tecnologici (uso di additivi, severi trattamenti termici) comportano maggiore rischio di nitrosazione delle ammine.

Diete sperimentali composte da alimenti contenenti ammine e nitriti inducono lo sviluppo di disordini epatici in animali di laboratorio, attribuiti alla formazione di N-nitrosammine a partire dalle ammine endogene e dai nitriti aggiunti ed una significativa eliminazione a livello urinario di nitrosammine (3).

In alimenti crudi, in partenza privi di nitrosammine, processi tecnologici, come la salagione e l'affumicamento, associati a trattamenti termici di cottura domestica (frittura) ne incrementano la formazione. Ammine come PUT e CAD, presenti in alimenti sottoposti a cottura, sono convertite rispettivamente in pirrolidina e piperidina, che per azione del calore originano le nitrosammine N-nitrosopirrolidina e N-nitrosopiperidina, molecole implicate nella produzione di composti oncogeni (ammine eterocicliche).

L'agmatina e le poliammine SPM e SPD, presenti in pesci e prodotti carnei, mostrano anch'esse la capacità di nitrosazione (4) in condizioni favorevoli, mentre tracce di altre nitrosammine (N-nitrosodimetil- e N-nitrosodietilammina) sono presenti in diversi alimenti dopo cottura.

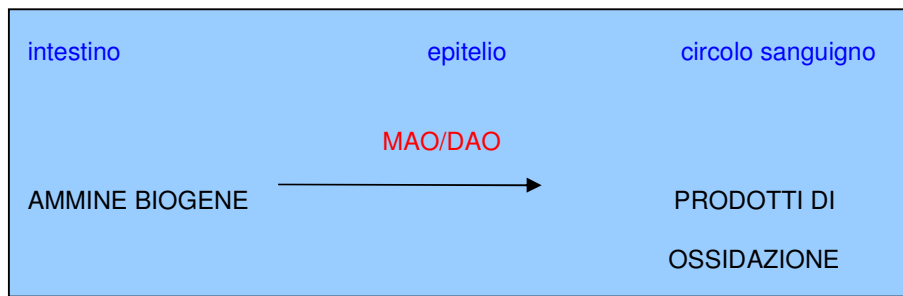
Oltre che per la formazione di nitrosammine, le monoammine e le diammine possono manifestare tossicità in relazione alle loro proprietà biologiche. In particolare livelli elevati di tiramina, vaso-attiva, e istamina, vaso- e neuro-attiva, presenti nella dieta possono risultare tossici particolarmente in soggetti sensibili. La tiramina, infatti, è compresa nel gruppo delle ammine pressorie (triptamina e β -fenilettilammina). La sua presenza negli alimenti comporta implicazioni tossicologiche legate alla capacità di interagire con l'azione di farmaci MAO inibitori (IMAO) inducendo crisi ipertensive

(79,80). La tiramina, infatti, agisce sia direttamente, aumentando l'attività cardiaca, sia indirettamente mediante il rilascio della noradrenalina dal sistema nervoso simpatico. Da un punto di vista sintomatologico l'intossicazione da ammine pressorie si manifesta con dilatazione delle pupille, lacrimazione e salivazione, aumento della frequenza respiratoria e del glucosio ematico (9).

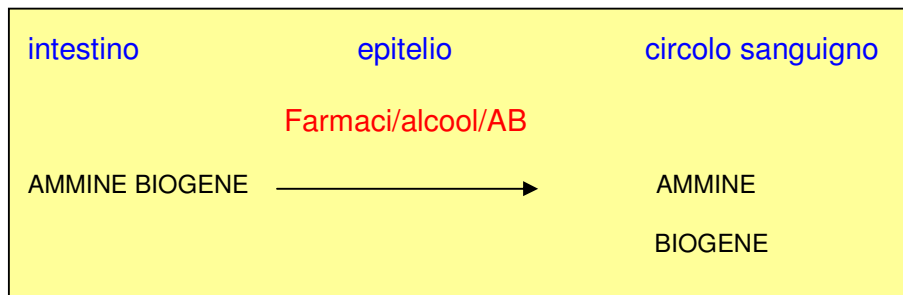
In consumatori non sensibili l'efficacia dei sistemi detossificanti riduce la soglia di tossicità della tiramina, anche ad elevate concentrazioni. Sperimentalmente è dimostrato che 400 mg non provocano, in soggetti sani, un significativo aumento della pressione sanguigna o altri disturbi (42). Viceversa in soggetti che fanno uso di farmaci IMAO (inibitori irreversibili delle MAO) nell'ambito di terapie antidepressive, tali concentrazioni determinano un effetto inibente sulle monoaminossidasi e quindi sul processo di

detossificazione dell'ammina. In tal modo concentrazioni di ammine pressorie, come la tiramina, derivanti dalla dieta possono raggiungere elevate concentrazioni ematiche scatenando crisi ipertensive nei pazienti (tab.2).

(a)



(b)



Tab.2 – rappresentazione schematica del sistema di detossificazione di AB (a) in assenza e (b) in presenza di agenti interferenti sull'azione di MAO e DAO (7)

L'incremento della pressione ematica è un effetto spesso associato al consumo di formaggi e per questo conosciuto anche come "Cheese

reaction". Formaggi, come il Gouda, Cheddar, Gruyere, Cheshire e Swiss, possono causare risposte tossiche se consumati in quantità eccessive. L'intossicazione causa forti emicranie, emorragie cerebrali o anche insufficienza miocardica in pazienti sotto trattamento IMAO. Anche il consumo di altri alimenti ricchi di tiramina (prodotti carnei, aringhe e fegato di pollo), può causare simili crisi. Segni e sintomi prodromici comprendono rigidità nucale, sudorazione, nausea e vomito, che regrediscono in genere dopo trattamento con farmaci antagonisti alfa-adrenergici (ad esempio fentolamina).

Pertanto nel corso di terapie che utilizzano IMAO-farmaci è sconsigliata l'assunzione di alimenti ricchi di tiramina ed è consigliato il proseguimento della restrizione dietetica per almeno 2 settimane dopo la sospensione degli IMAO, per permettere all'organismo di risintetizzare gli enzimi detossificanti (tab.3). Viceversa il rischio di

crisi ipertensive da tiramina risulta ridotto nei soggetti che assumono RIMA (farmaci antidepressivi inibitori reversibili delle MAO), come la moclobemide.

TUTTI I FORMAGGI TRANNE QUELLI FRESCI
CARNE: fegato di vitello, fegato di pollo, salsicce stagionate, salumi, mortadella,
PESCE: caviale, pesce sottoaceto o affumicato non surgelato, aringa, pesce seccato, scampi
FRUTTI: frutti troppo maturi
ALTRI CIBI: estratti di carne
BEVANDE vino, birre fermentate non filtrate

Tab. 4: Alimenti da evitare in corso di terapie con farmaci IMAO (81)

Per quanto riguarda l'istamina, essa può causare sintomi di leggera intossicazione in soggetti sensibili (soggetti allergici) anche a livelli modesti (50-100mg/Kg), se introdotta per via alimentare in

combinazione con elevati quantitativi di PUT e CAD. Queste ammine, di per sé prive di effetto tossico, tuttavia vanno a competere per l'attività detossificante degli enzimi facilitando il passaggio dell'istamina attraverso la mucosa intestinale.

Ingerita in dosi significative, dopo un periodo di incubazione che varia da qualche minuto a qualche ora, l'ammina può, invece, determinare, una vera e propria crisi istaminergica, che si manifesta con nausea, vomito, diarrea, crampi addominali, rush cutanei, orticaria, edemi, infiammazione localizzata, ulcere orali. In altri casi compaiono ipotensione, emicrania, palpitazioni, formicolii, vampate di calore e sudorazione. Nei casi acuti e gravi l'intossicazione può indurre broncospasmo, soffocazione e grave difficoltà respiratoria **(82)**.

Tale sintomatologia può manifestarsi oltre che nei soggetti sensibili anche in consumatori sani in seguito all'ingestione di alimenti di

origine animale che, di norma, contengono quantità elevate dell'ammina. In particolare il consumo di pesci appartenenti alle famiglie *Scombridae* e *Scomberesocidae* (tonni, sauri, sgombri, etc.), *Clupeidae* e *Engraulidae* (sardine, aringhe, sardelle, acciughe, etc.), *Coryfenindae* (lampuga) o *Pomatomidae* (pesce serra), è implicato frequentemente in forme di intossicazione da istamina (42).

Di norma in soggetti sani un efficiente sistema di detossificazione (DAO e istamina-N-metil-tranferasi) presente nel tratto intestinale metabolizza l'istamina introdotta con la dieta e quella prodotta dai batteri intestinali, evitando effetti tossici.

Tuttavia alcuni fattori possono condizionare tale detossificazione anche in soggetti non sensibili. In primo luogo la simultanea presenza di altre ammine può potenziare l'attività biologica dell'ammina vaso-attiva. In animali da laboratorio la somministrazione per os di PUT,

CAD, tiramina, triptamina, β -fenilettilammina, seguita da quella di istamina aumenta di un fattore 10 la reazione dell'istamina. SPM e SPD contribuiscono aumentano l'entità del trasporto dell'ammina in circolo attraverso la parete intestinale (tab.5,6).

AMMINA	Effetti farmacologici
Istamina	liberazione adrenalina e noradrenalina stimolazione muscolatura liscia di utero, intestino, tratto respiratorio stimolazione neuroni motori e sensoriali controlla secrezione gastrica
tiramina	vasocostrittore aumento battito cardiaco lacrimazione e salivazione aumento della glicemia emicrania
putrescina- cadaverina	ipotensione bradicardia potenziamento tossicità ammine biol. attive
2-fenilettilammina	rilascio noradrenalina aumenta pressione sanguigna emicrania
triptamina	aumenta la pressione sanguigna

Tab.5: ammine biogene e i loro effetti farmacologici

In secondo luogo esiste una capacità individuale di detossificazione di poliammine e AB attraverso reazioni di acetilazione e ossidazione

mediate dai sistemi enzimatici MAO, DAO e PAO. Va ,inoltre, considerato che alcune fasce di consumatori (soggetti con problemi respiratori e coronarici, quelli affetti da ipertensione o carenza di vit. B₁₂) sono particolarmente a rischio, perché sensibili anche a bassi livelli di ammine. In pazienti con patologie gastrointestinali (gastriti, sindrome del colon irritabile, malattia di Crohn, ulcere gastriche e del colon) il consumo di alcuni alimenti (ad esempio un abbondante pasto a base di formaggio, crauti o salumi e vino) rappresenta un particolare rischio, perché l'attività intestinale delle ossidasi è di norma minore rispetto a quella di individui sani.

Ancora in alcuni casi il rischio tossicologico può essere collegato alla contemporanea introduzione di IMAO e farmaci DAO-inibitori (farmaci utilizzati nella cura delle malattie di Alzheimer e Parkinson), o anche a particolari condizioni fisiologiche, ad esempio nelle donne

in fase premenstruale il consumo di ammine può rappresentare un problema poiché nel loro organismo si riscontra una temporanea riduzione dell'attività delle MAO B-type.

AMMINA	intossicazione istaminica	emicrania	interazione IMAO	formazione nitrosammine	altri effetti
istamina	+++	++	+++	+	tossicità epatica
tiramina	+	+++	+++	+	tossicità neurologica
6-fenilalanina	+	++	+++	+	tossicità neurologica
serotonina	-	-	+++	+	tossicità gastrica e cardiaca
triptamina	+	-	+	+	-
putrescina	+	-	-	+	-
cadaverina	+	-	-	+	-
spermidina	+	-	-	+	-
spermina	+	-	-	+	-
agmatina	-	-	-	+	-

Tab.6: Rischio tossicologico associato al consumo di alimenti contenenti AB (3)

2.2. Presenza di ammine biogene negli alimenti di origine animale

Le AB possono essere riscontrate, per effetto dell'attività microbica, in prodotti molto diversi come le carni, i vegetali, i prodotti ittici, il vino e nei prodotti fermentati e in quelli lattiero caseari (8, 33, 41).

In generale prodotti alimentari (salumi, yogurt), ottenuti mediante processi fermentativi (in corso di maturazione e di stagionatura) o che nel corso dello stoccaggio o della conservazione siano esposti a contaminazione microbiologica, contengono quantitativi variabili delle diverse ammine, anche se sottoposti a trattamenti termici.

Alcuni prodotti come pesci sgombroidi e non (ad es.: sardine, sardelle, acciughe, aringhe), formaggi, prodotti a base di carne ed alcune bevande possono contenere livelli elevati di ammine biologicamente attive e sono, pertanto, considerati alimenti a rischio.

Inoltre, sebbene di norma si formino nel corso di processi alterativi per decomposizione dell'alimento seguiti da proteolisi e sviluppo batterico, alte concentrazioni di ammine si riscontrano prima che l'alimento mostri segni di alterazione o sia inaccettabile dal punto di vista organolettico.

DERIVATI DEL LATTE - AB sono presenti in piccole quantità nel latte (anche in polvere) e derivati, ma discrete concentrazioni di tiramina, istamina, putrescina, cadaverina, spermidina, triptamina e β -feniletilammina si rinvencono soprattutto in molti tipi di formaggi.

Nel corso della maturazione di questi prodotti enzimi proteolitici operano la degradazione della caseina con aumento della quota di amminoacidi liberi. Questi in seguito a successive degradazioni catalizzate da decarbossilasi batteriche danno origine alla formazione di ammine e CO₂ (42).

I principali fattori che condizionano la produzione di AB nei formaggi sono la disponibilità di amminoacidi, valori di pH e concentrazione salina favorevoli, ma soprattutto qualità igienica del latte di partenza che, se caratterizzato da elevata carica microbica, induce la produzione di formaggi ad elevato tenore amminico (tab.7).

FORMAGGIO	n° CAMPIONI	ISTAMINA (mg/Kg)	TIRAMINA (mg/Kg)
Taleggio	5	ass-4	ass-3
Formaggi vari	32	tr-846	tr-1.460
Gorgonzola dolce	3	33-86	135-520
Gorgonzola naturale	3	49-439	78-399
Formaggio fresco	14	ass-238	*
a breve stagionatura	17	6-649	*
a media stagionatura	13	237-548	*
a lunga stagionatura	10	279-912	*
Gorgonzola	7	8-94	31-84
Taleggio	4	2.5-124	18
Primosale	*	tr-70	tr-54
Caciocavallo	*	3-119	4-111
Pecorino	*	41-94	44-79
Formaggi vari	6	ass	ass-997

Tab.7 : Concentrazioni di AB in differenti formaggi italiani

Nell'ambito della stessa tipologia si rilevano ampie variazioni nel contenuto di ammine, con concentrazioni più elevate nei prodotti a

lunga maturazione ed in quelli che prevedono come modalità tecnologica l'uso di muffe selezionate (es.. f. *erborinati*).

Molti microrganismi, sia contaminanti, sia costituenti colture starter, possono essere considerati responsabili della biogenesi di ammine nei formaggi e nei prodotti lattiero-caseari. E' quindi indispensabile una materia prima di buona qualità, l'uso di starter selezionati e un continuo controllo delle condizioni igieniche durante ogni fase produttiva **(51)**.

Specie microbiche appartenenti al genere *Enterococcus*, *E. faecalis* e *faecium* **(52)** presenti nei derivati del latte hanno attività decarbossilante prevalentemente sull' amminoacido tiroxina, quella a carico dell'istidina è ampiamente riscontrata nei generi *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, ma solo alcune specie sono in grado di produrre quantità di istamina a

livelli importanti dal punto di vista tossicologico, in particolare *Lactobacillus buchneri* e *S. faecalis* (43). La capacità di produzione di AB da parte dei lattobacilli è stata studiata in diversi tipi di formaggi valutando anche l'influenza esercitata da diversi parametri tecnologici (stagionatura, pH, concentrazione salina) sulla produzione di ammine (9,53), mentre è noto che l'uso di differenti temperature nei trattamenti termici del latte non influenza la produzione di istamina e tiratina in questi prodotti (54).

Anche se, in genere, i livelli rilevati sono al di sotto dei valori ritenuti tossici, il problema della presenza di ammine nei derivati del latte non va, comunque, sottovalutato in quanto l'assunzione globale dei composti comunque presenti nella dieta può risultare in alcuni casi superiore ai limiti di sicurezza. Quindi nella valutazione di tali limiti non vanno considerate le singole ammine, bensì la loro sommatoria.

Dal punto di vista della sicurezza alimentare per i formaggi non dovrebbero essere superati 300 mg/Kg di ammine, come somma di istamina, tiramina, putrescina e cadaverina (55). Alcuni Paesi (Svizzera) hanno stabilito limiti massimi nei formaggi fino a 1000 mg/Kg (somma di istamina, tiramina, putrescina, cadaverina e 2-feniletilammina) (42).

Va considerato anche che le AB nei formaggi si formano durante il periodo di sviluppo dei batteri lattici (*Lactococcus lactis* var., *lactis* spp. *cremoris*, *Leuconostoc cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*) o in seguito all'autolisi nei formaggi a lunga stagionatura (42).

FATTORI INFLUENZANTI LA PRODUZIONE DI AB FORMAGGI

- disponibilità di amminoacidi
- disponibilità di piridossalfosfato
- carattere di ceppo
- pH (max produzione a pH 5.5)
- temperatura (max a 30 °)
- attività mono e diammino ossidasi
- durata della maturazione

UOVA – Putrescina e spermidina sono le ammine più frequentemente rinvenibili nelle uova, ma ridotte concentrazioni di agmatina e cadaverina possono essere presenti naturalmente e non rappresentano necessariamente il prodotto della contaminazione batterica (56).

CARNE E PRODOTTI CARNEI - Le ammine di più frequente riscontro nelle carni dei mammiferi domestici sono spermidina, spermina, naturalmente presenti, e putrescina, cadaverina e tiramina.

Durante lo stoccaggio delle carni , ed in relazione alla temperatura, si osserva che spesso i livelli di spermidina e spermina tendono a diminuire, mentre tendono ad aumentare quelli delle altre ammine. Si ritiene, a tale proposito, che il contenuto di spermina in prodotti alterati (carnei o non) decresca poiché essa è utilizzata come fonte di azoto da alcuni batteri (64).

Nelle carni fresche di *suino* sono presenti in discrete concentrazioni spermidina, spermina e solo tracce di altre ammine (65). Se stoccate a 15°C l'incremento del contenuto totale di AB risulta temperatura-dipendente; la conservazione a 4°C è in grado di produrre una significativa riduzione dei i livelli di AB (66). Gli incrementi dei livelli di putrescina, cadaverina e istamina nelle carni suine appaiono correlati in modo significativo anche con la concentrazione dell'azoto basico volatile (ABVT).

Le modalità di confezionamento della carne fresca hanno influenza sulla produzione dei composti nel corso della conservazione. In carni bovine fresche, confezionate sottovuoto e stoccate a 1°C per 120 giorni, si riscontra la formazione di ammine presenti a livelli significativi a partire dal ventesimo giorno di conservazione. Si è anche osservato che, sebbene le caratteristiche organolettiche dei

prodotti fossero ritenute accettabili, il contenuto totale delle ammine presenti poteva comportare rischio per la salute di consumatori sensibili .

Si ritiene che la determinazione del profilo amminico possa essere utilizzata ai fini della valutazione della conservabilità. Le AB sono considerate validi indicatori di alterazione sia delle carni rosse (carni bovine) che delle carni bianche (carne di pollo) (67). In particolare la determinazione delle concentrazioni di cadaverina può essere utilizzata per monitorare l'alterazione di entrambi i tipi di carne, mentre quella della tiratina per le carni rosse.

Nella carne di *pollo* le ammine aumentano prima e più rapidamente che nella carne bovina e, quindi, la conservazione di queste carni risulta essere più critica. Probabilmente questo si deve ascrivere alla presenza di fibre muscolari più corte di quelle dei bovini e anche alla

presenza di proteine con catene più corte, che sarebbero, quindi, più facilmente attaccabili da parte degli enzimi proteolitici. Ciò determinerebbe una maggiore produzione di precursori per la sintesi amminica(67,68).

Nei *prodotti carnei stagionati* la proteolisi libera amminoacidi ed è favorita dalla denaturazione proteica conseguente all'aumento di acidità, alla disidratazione e all'azione del cloruro di sodio (74).

La fase di maturazione è considerata un fattore importante nella formazione di ammine, le fermentazioni batteriche che predominano in questa fase condizionano una grande variabilità del profilo amminico, per cui salumi con profilo microbico simile possono differire nel contenuto di ammine, indicando che la produzione di tali composti dipende da una complessa interazione di fattori (69). In salami e soppressate prodotti in Italia meridionale, l'ammina più

rappresentata è la tiramina (fino a 500 mg/Kg), seguita da putrescina e cadaverina, la 2-fenilettilammina è stata rinvenuta a livelli molto ridotti e l' istamina soltanto in alcuni campioni di soppressata (50 mg/Kg) (70).

Nei prodotti industriali i livelli di AB non differiscono da quelli presenti in prodotti artigianali e quindi la presenza di colture starter commerciali non sembra inibire la produzione di AB (70).

La produzione di ammine nella carne ed in prodotti carnei può essere attribuita all'azione di diversi microrganismi: *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *enterococchi*, *lattobacilli* (71,72). Questi ultimi spesso usati come colture starter selezionate, pure o miste, e formate da microrganismi non produttori di ammine possono contribuire a ridurre i livelli di ammine, grazie alla capacità di ostacolare per competizione la crescita della microflora produttrice (75).

Nel corso delle fermentazioni il pH rappresenta uno dei fattori chiave dell'attività amminoacidica decarbossilasica. Infatti è stata evidenziata una correlazione tra produzione di ammine e riduzione dei valori di pH nei salumi in seguito alla fermentazione lattica. La rapida e brusca riduzione del pH riduce la crescita dei microrganismi ammino-positivi, particolarmente delle enterobacteriaceae. Viceversa elevate produzioni di istamina possono essere messe in relazione con l'inadeguata diminuzione del pH nei primi giorni del processo di maturazione. Il rapporto sale/acqua è un altro importante fattore di controllo della crescita microbica. Concentrazioni di NaCl comprese tra 3.5% e 5.5% sembrano inibire la produzione di istamina (76) e in parte delle altre ammine..

Il diametro degli insaccati influenza l'ambiente in cui i microrganismi crescono Si ritiene esista una correlazione tra la misura degli insaccati

e il contenuto di AB. Un diverso diametro, infatti, condiziona un diverso grado di anaerobiosi, di potenziale redox, di concentrazione di sale e di valore di α_w . Nei salumi con diametro maggiore è, di solito, più bassa la concentrazione di sale e maggiore la quantità di acqua, ciò sembra favorire una maggiore produzione di alcune ammine come tiramina e putrescina. Generalmente insaccati con diametri più grandi si accompagnano a livelli di ammine maggiori di quelli presenti in prodotti di minore calibro. Inoltre nella parte centrale dei prodotti si riscontrano concentrazioni di ammine maggiori rispetto a quelle presenti nelle parti periferiche.

D'altro canto alcune fasi tecnologiche nella produzione di prodotti carnei possono influenzare la produzione di AB. L'aggiunta di zucchero, facendo aumentare la crescita di colture starter, riduce la produzione dei composti **(66)**. L'additivazione di sodio solfito (500

mg/Kg) riduce la produzione di cadaverina (non quella di tiramina)

(22). L'aggiunta di sodio nitrito (150 mg/Kg) riduce l'accumulo di putrescina e cadaverina, ma aumenta di tre volte la concentrazione di istamina (77).

In definitiva molti fattori concorrono nel determinare una notevole variabilità nel il profilo amminico degli insaccati, e, principalmente, la scelta delle colture starter, la durata della stagionatura, le differenze della microflora decarbossilasi-positiva naturalmente presente, le modalità di produzione dei salumi, il tipo e la qualità di carne utilizzata, la durata della maturazione (69) e le temperature di stoccaggio dei prodotti.

PRODOTTI ITTICI - Da tempo pesci e prodotti ittici sono considerati con molta attenzione in relazione al contenuto in ammine biogene. La maggiore quota di istamina presente nei prodotti ittici e

responsabile dei fenomeni di intossicazione nell'uomo è espressione dell'attività batterica. L'origine dell'istamina è riconducibile solo in minima parte a fenomeni autolitici d'origine tissutale, poiché la sua produzione è dovuta all'azione di decarbossilasi batteriche sugli amminoacidi liberi già durante le prime fasi dei processi degradativi tissutali.

L'attività dell'enzima istidino-decarbossilasi è in funzione di diversi fattori, primo fra tutti il contenuto di istidina nel substrato. Alcuni pesci, principalmente appartenenti alla famiglia *Scombridae*, presentano una muscolatura particolarmente ricca di istidina libera che può essere decarbossilata in istamina (57). In secondo luogo è nota l'incidenza della temperatura sulla formazione di AB nei pesci. La loro produzione avviene sia a temperature moderate che elevate e, in particolare, la formazione di istamina è massima a temperature di

37,8°C. Viceversa la conservazione del prodotto a basse temperature a risulta sfavorevole alla produzione di ammine; se stoccati a 0°C prodotti ittici ne contengono livelli ridotti di istamina fino a 18 giorni, se conservati a 10°C presentano concentrazioni fino a 1g/Kg già dopo 5 giorni (58).

La produzione di istamina è un importante criterio di valutazione di freschezza/deterioramento dei prodotti ittici. Tuttavia la produzione dell'ammina può non essere accompagnata da cambiamenti delle caratteristiche organolettiche o produzione di cattivi odori; infatti un pesce può contenerne in elevate quantità, pur manifestando colore e odori normali.

Molti autori hanno proposto diversi indici di valutazione della freschezza dei prodotti ittici, ma quello ritenuto più attendibile è

l'indice delle ammine biogene (BAI) o indice di Karmas utilizzato nell'ambito di un metodo HPLC a più variabili statistiche, che considera, quali indicatore chimico di qualità dei prodotti ittici, la valutazione dei livelli di cinque ammine biogene:

$$\text{BAI} = \frac{\text{HSM} + \text{PUT} + \text{CAD}}{1 + \text{SPR} + \text{SPD}}$$

Legenda: HSM: istamina (mg/Kg); PUT: putrescina (mg/Kg); CAD: cadaverina (mg/Kg);
SPR: spermina (mg/Kg); SPD: spermidina (mg/Kg)

Tale indice può essere favorevolmente correlato con le caratteristiche organolettiche del prodotto ed il risultato espresso con un punteggio da 1 a 10. Per valori di $\text{BAI} \leq 1$ il livello di qualità è considerato “buono”; da 1 a ≤ 10 “accettabile”; >10 indica il prodotto “decomposto”.

L'istamina, comunque, è l'unica ad essere responsabile dei fenomeni di intossicazione (*Scombroid fish poisoning*), sebbene le altre ammine biogene svolgano un ruolo sinergico o potenziante.

I batteri generalmente responsabili della produzione di alti livelli di istamina sono soprattutto *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonaceae*. Tra i più potenti produttori di istamina si possono citare anche *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*, *Pseudomonas spp.* e specie Gram positive, come alcuni *Bacillus* e varie specie di micrococchi e lattobacilli.

Nei casi di intossicazione risultano determinanti la contaminazione del prodotto da *Morganella morganii*, la temperatura di conservazione e l'intervallo di tempo intercorso tra la cattura e l'applicazione delle temperature di refrigerazione. Di norma è considerato critico un intervallo di tempo superiore a tre ore dopo la cattura. **(60)**.

Stabilire limiti tossicologici per l'istamina è piuttosto complesso: è necessario prendere in considerazione più variabili (concentrazioni istamina, sommatoria concentrazioni altre AB, fasce di consumatori sensibili, etc.), inoltre i dati bibliografici spesso non sono concordanti.

Secondo la FDA (Food and Drug Administration), 290 mg/Kg di istamina nel tonno indicano una cattiva manipolazione, 500 mg/Kg rappresentano un livello potenzialmente tossico. Alcuni autori **(61)**

propongono come parametri di riferimento i seguenti valori:

<50mg/Kg: assenza di sintomatologia; 50-100mg/Kg: possibile comparsa di sintomatologia in soggetti sensibili; 100-1000mg/Kg: tossicità moderata; 15.000 mg/Kg: tossicità elevata.

Tra le diverse specie appartenenti alla Famiglia *Scombridae* le sardine, seguite da sgombri, alici e tonno **(60)**, possiedono le concentrazioni medie più elevate. Nel caso dei prodotti ottenuti da

questi pesci in seguito a processi di maturazione enzimatica e trattamento con salamoie la produzione di ammine è ostacolata dall'uso di elevate concentrazioni saline (fino a 5-8%) utilizzate nella tecnologia, che possono influire negativamente sulla moltiplicazione batterica. La salagione controlla (ma non impedisce) la produzione di istamina, grazie all'effetto inibitorio del cloruro di sodio sull'attività batterica. Una percentuale di sale inadeguata può, però, permettere la proliferazione dei microrganismi produttori di istamina anche dopo l'inscatolamento e per questo spesso le semiconserve sono ritenute responsabili di casi di intossicazione. Altri fattori in grado di condizionare lo sviluppo della microflora ittica e dei livelli di AB, L'uso di additivi come il potassio sorbato, acidulanti come acido citrico, malico e succinico, e la presenza di spezie, come cannella e

chiodi di garofano, mentre la sterilizzazione non ne riduce significativamente il contenuto **(62)**.

Un'altra modalità di controllo della produzione di AB nei prodotti ittici è rappresentata dall'utilizzo di atmosfere ricche di anidride carbonica nel confezionamento in MAP (Modified Atmosphere Packaging) **(63)**. Questa tecnologia comporta la sostituzione dell'aria, normalmente presente nella confezione, con uno o più tipi di gas, da soli o in miscela tra loro, in concentrazioni appositamente studiate per il controllo dello sviluppo della flora microbica dell'alimento e la stabilizzazione delle caratteristiche sensoriali e ha lo scopo di prolungarne la shelf-life. Tra i gas utilizzati la CO₂ esplica una vera e propria azione antimicrobica, di tipo batteriostatico, ed è capace di ridurre efficacemente la produzione di AB nei prodotti ittici. Tuttavia non è opportuno programmare una miscela formata per il 100% da

anidride carbonica, ma, al fine di prevenire la crescita di Clostridium botulinum, è consigliabile utilizzare anche basse percentuali di ossigeno.

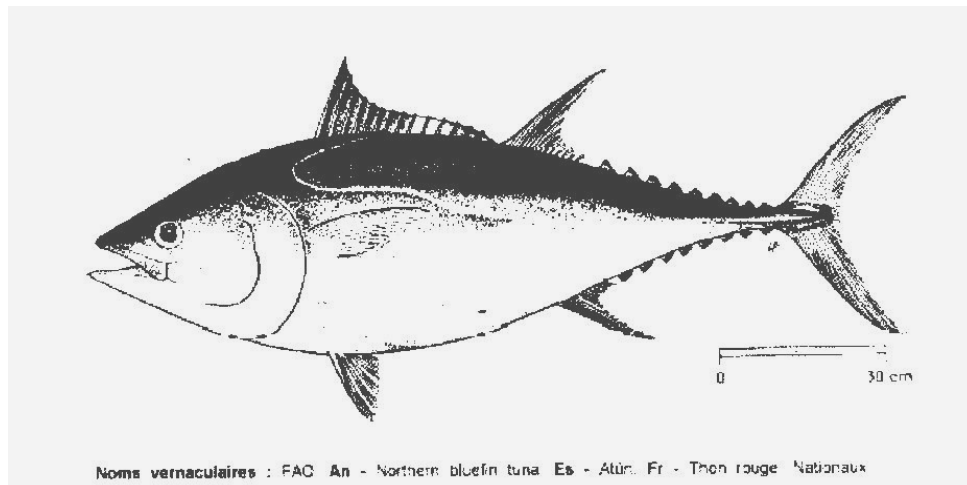
MICROORGANISMI	ALIMENTO	AMMINE
Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Clostridium perfringens, Enterobacter aerogenes, Bacillus spp, Staphylococcus xylosum	pesci	istamina, tiramina, cadaverina, putrescina, agmatina, spermina, spermidina
Lactobacillus buchneri, L. bulgaricus, L. plantarum, L. casei, L. acidophilus, L. arabinosus, Enterococcus faecium, S. mitis, Bacillus macerans	formaggi	istamina, tiramina, cadaverina, putrescina, beta-fenilettilamina, triptamina
Pediococcus spp., Enterobacteriaceae, Lactobacillus spp., Pseudomonas spp., Enterococcus spp	carne e prodotti carnei	istamina, tiramina, cadaverina, putrescina, beta-fenilettilamina, triptamina
Lactobacillus plantarum, Pediococcus spp., Leuconostoc mesenteroides	vegetali fermentati	istamina, tiramina, cadaverina, putrescina, triptamina

Tab.8: Microrganismi isolati e ammine presenti in alimenti di origine animale

CAPITOLO III

3.1 *Thunnus thynnus*: caratteristiche anatomiche e modalità di pesca

Il *Thunnus thynnus* o tonno rosso appartiene alla classe degli Osteiti, ordine Perciformes, sottordine Scombroidei, famiglia Scombridae.



A seconda del peso i tonni assumono nomi diversi. In Italia si definiscono “tonnacchioli” quelli con un peso che si aggira tra i 4 e 10 Kg, “tonnicelli” con un peso da 20 a 60 Kg, “tonnocoli” o mezzi tonni con un peso da 60 a 100kg e “tonni da stellato” con un peso oltre i 100Kg (83).

Il corpo, allungato e fornito di carena, è rivestito totalmente da squame piccole, più grandi e più spesse per formare il *corsaletto* nella regione pettorale che, scendendo verso il basso, circondano la base delle ventrali e si prolungano caudalmente. La prima pinna dorsale è composta da 12-15 raggi duri, la seconda è invece più corta. Le pinne pettorali sono piccole, per tale motivo è infatti denominato come “tonno ad ali corte”, a forma di triangolo isoscele. La pinna anale si trova simmetricamente alla seconda pinna dorsale. Le pinnule hanno un numero variabile, da 7 a 9, sia dietro la seconda pinna dorsale, sia dietro la pinna anale. La pinna caudale è bilobata o ad ampio raggio. Le pinne ventrali, in posizione toracica, presentano appendici bifide e formano il *processo intrapelvico*. La testa è di piccole dimensioni, gli occhi hanno l'iride giallo, la bocca è piccola, le mascelle sono provviste di piccoli di denti appuntiti disposti su una sola fila sul vomere e sui palatini. L'*opercolo* e il *preopercolo* sono lisci e sprovvisti di squame. Il dorso è di colore blu scuro, il ventre e i fianchi grigiastri, chiazzati inferiormente di colore argenteo. La prima pinna dorsale, le pettorali e le ventrali sono di colore bruno scuro, la pinna caudale è

bluastro, la seconda pinna dorsale è di colore giallo brunastro, quella anale è rossa. Le pinnule sono gialle e talvolta con macchiettature brune. Il giugulo è striato longitudinalmente. Nei giovani la regione ventrale è percorsa da striature verticali di colore argenteo.

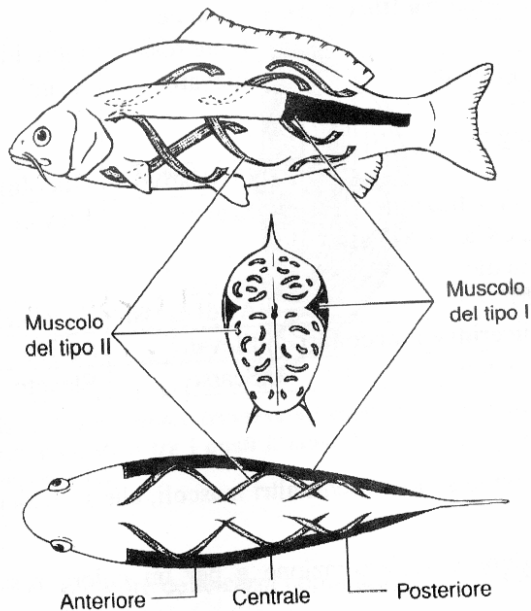
Sono presenti circa 39 vertebre, manca la vescica natatoria, sono presenti da 34 a 43 *branchio-spine* (strutture interne che impediscono al cibo di passare dal faringe alla camera branchiale) sul primo arco branchiale, lo stomaco è oblungo a parete spessa, il fegato è grande e rosso, la milza è scura, la cistifellea aderisce all'intestino e il cuore angoloso.

Il colore delle carni, come in tutti i pesci grassi, varia in relazione allo stadio di sviluppo del pesce e a quello di riposo o maturazione delle gonadi.

Le carni del tonno giovane hanno un colorito roseo. Nel periodo di maturazione delle gonadi diventano di un colorito rosa carico. Il colore diventa poi rosso intenso, nel “tonno da corsa”, le cui carni sono sode e consistenti.

La muscolatura è costituita da *miomeri*, fra i quali si interpongono delicati setti di tessuto connettivo rappresentati da *miosetti*. Sono presenti due tipi

muscolari: fibre bianche e fibre rosse, le prime hanno un decorso elicoidale, le seconde sono disposte parallelamente all'asse longitudinale.



Nel tonno, pesce sportivo, prevale la muscolatura rossa, nella quale sono presenti altri muscoli di colore rosso più carico, caratterizzati da maggiore vascolarizzazione, rappresentati dal muscolo *sottocutaneo o di Vogt*. Se si pratica una sezione al termine dei lunghi raggi della prima dorsale tale muscolo assume una caratteristica figura che somiglia al seme di cuori delle carte francesi.

Il colore rosso chiaro è comunque predominante, infatti serve a qualificare ufficialmente tale prodotto, che viene indicato anche con il termine di “tonno rosso” (L. n. 699 del 24 Novembre 1981 e DL.vo 15 Luglio 1983 del Ministero della marina mercantile).

Il tonno è un veloce pesce azzurro, pelagico, gregario e migratore; è carnivoro e insegue branchi di sgombri e clupeidi. Vive nel bacino del Mediterraneo e nell’Atlantico orientale, dalla Norvegia alle coste del Senegal.

I tonni presentano una fase gregaria, tipica dei soggetti prepuberi e dei soggetti dalle gonadi mature del periodo genetico, ed una fase “erratica” che interessa invece i soggetti che hanno fregato. Nel periodo di riposo sessuale, definito anche come “intergenetico”, che corrisponde al periodo autunno-inverno, i tonni erratici, comunemente denominati “golfitani”, isolatamente si dedicano alla pastura in acque profonde alcune centinaia di metri, dove rimangono fino a primavera. Dopo la cattiva stagione, e influenzati dalle modificazioni fisico-chimico delle acque superficiali, si riportano in superficie dove si sviluppa il plancton ricercato dai clupeidi.

Inoltre, in questa fase, comincia la maturazione delle gonadi che si completerà poi nei mesi di aprile e maggio. Questo è il periodo genetico : il tonno smette di alimentarsi e attraverso grandi spostamenti si dirige in branco verso la costa ed è allora definito *tonno di corsa o di arrivo*. In questa fase i tonni incappano nelle tonnare “di corsa”, che li catturano nel loro primo passaggio; ciò avviene generalmente tra la seconda metà di maggio e tutto giugno.

Il periodo di frega può subire delle ampie oscillazioni legate al clima, all’ambiente, alla temperatura, alla salinità e alla profondità dell’acqua. Generalmente più tardivi sono i soggetti più grossi, che si mantengono sempre lontano dalle coste, perché necessitano di acque meno calde. Dopo la frega, il tonno scompare nuovamente dalle acque superficiali e costiere per raggiungere profondità non superiori a 500 metri. Ha così inizio il periodo intergenetico.

In relazione ai diversi periodi biologici del tonno l'uomo utilizza mezzi diversi per la sua cattura. La pesca del tonno rosso vanta una forte tradizione nelle marinerie meridionali, soprattutto in alcune regioni quali Campania, Calabria, Sardegna e Sicilia. La pesca marittima è disciplinata principalmente dal D.P.R. n 1639 del 2 Ottobre 1968 recante il regolamento per l'esecuzione della Legge n° 963/65 .

Il sistema di pesca dei tonni più antico e conosciuto si identifica nelle *tonnare fisse*, previsto dall'art. 6 del citato D.P.R. e legato a tradizioni popolari e culturali di alcune regioni come la Sicilia (compartimenti marittimi di Trapani e Palermo) e la Sardegna (compartimento di Cagliari). Le tonnare fisse costituiscono un sistema di reti fisse stabilmente ancorate, che sfrutta le caratteristiche biologico-comportamentali dei tonni: durante le migrazioni riproduttive i tonni percorrono lungo le coste un itinerario fisso. In Italia esistono due tipi di tonnara: "di golfo" e "di punta". Le prime sono impiantate nei golfi, a ridosso delle correnti, mentre le seconde vengono collocate all'estremità di capi e promotori dove l'acqua, migliore, è frequentata da soggetti di dimensioni maggiori di quelli golfitani.

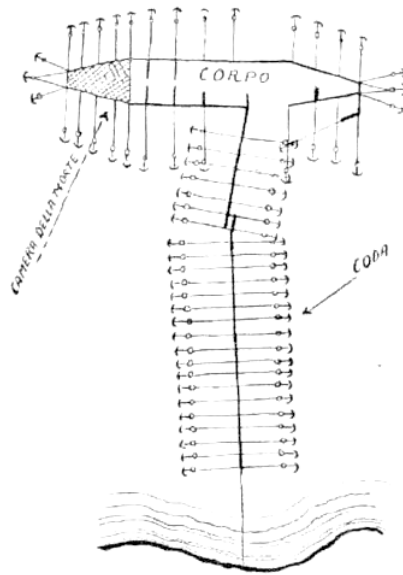


fig.2 - tonnara

La tonnara viene approntata generalmente su fondali di 30 metri, è costituita da una rete verticale detta “coda”, di lunghezza variabile fino a 3 km, che rappresenta lo sbarramento per i pesci che si dirigono verso la costa o che da essa guadagnano il mare libero. Unita alla “coda” è l’ “isola”, formata da un sistema di scompartimenti susseguenti detti “camere”. Queste sono formate da pareti di reti alte circa 50 metri fissate al fondo attraverso ancore pesanti comunicanti tra loro mediante “porte”, che possono essere chiuse da reti mobili verticali. Il tonno seguendo la sua corsa può entrare

direttamente all'interno della prima camera, definita "camera grande", oppure può esservi indirizzato battendovi a livello della coda : una volta dentro non ha alcuna possibilità di tornare indietro e, imboccando le porte successive, si ritrova a raggiungere la "camera della morte". I pescatori controllano continuamente il movimento dei pesci, e quando osservano l'arrivo del branco, ne provocano il passaggio da una camera all'altra, spaventando i tonni con oggetti vari e precludendone l'uscita mediante la chiusura delle porte. Il pavimento della camera della morte viene gradualmente sollevato verso la superficie, cosicché i tonni, diminuendo lo specchio d'acqua , si ammassano in superficie e sono catturati. Un altro sistema di pesca, più remunerativo del precedente è rappresentato dalle *reti a circuizione*. Il prodotto che si ottiene è meno stressato, presenta un rigor mortis che inizia più tardivamente e si protrae più a lungo, poiché tale sistema induce uno strascico limitato e una cattura piuttosto rapida.

Le reti a circuizione sono quelle calate in mare al fine di recingere e catturare, con immediata azione di recupero, un branco di pesci. I banchi di tonno, avvistati per mezzo di un elicottero, vengono circondati dalla rete

che presenta nella parte sommersa un cavo di chiusura all'interno del quale i pesci vengono imprigionati.

Reti a circuizione moderne di grandi dimensioni e molto robuste sono rappresentate dalle *tonnare volanti*, destinate alla pesca lungo le coste di tonni rossi prepuberi in fase gregaria.

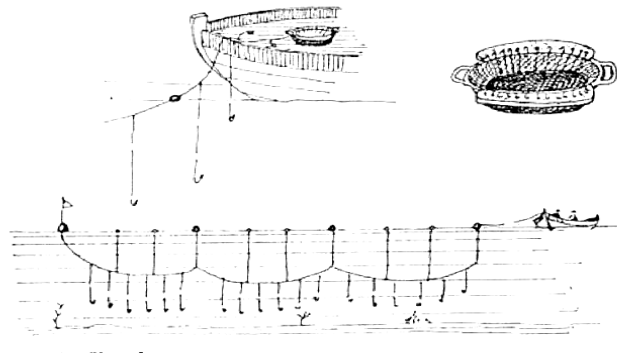


Fig.3 - Palangaro

Un altro tipo di pesca (fig.3) utilizzata nel Mar Mediterraneo prevede l'uso di parangali, lenze a supporto orizzontale, detta *trave, corda, fila o letto del conso*, da cui pendono numerosi braccioli recanti ami innescati con sgombri o sarde. Il palangaro, posto a mezz'acqua e calato a una profondità di 15-20 metri, è sostenuto da boe poste a 250 metri l'una dall'altra segnalate da bandiere o luci. Al momento del recupero, man mano che

vengono alla superficie, i tonni sono prontamente arpionati, messi in coperta, decapitati e eviscerati e introdotti nel tunnel per la congelazione rapida. Questa modalità di pesca, al vantaggio di produrre buone quantità di pesce di elevata qualità, oppone un impatto negativo su specie marine protette.

Infine va citata la pesca tradizionale con *camiu*, lenza a supporto verticale, di tipo fisso, non galleggiante, appostata per tempi più o meno lunghi in mare nello stretto di Messina. Tale pesca, realizzata nei mesi che vanno da febbraio a maggio con piccole imbarcazioni, di circa sei metri, e con un equipaggio di due persone, è sempre più in disuso sia per l'avvento di grosse imbarcazioni che pescano sconsideratamente nel Mediterraneo, sia per il passaggio di tonni notevolmente diminuito.

3.2 Il tonno e i prodotti a base di tonno

Dati FAO (2002) indicano che il commercio della pesca mondiale delle varie specie di tonno a partire dal 1950 è stato caratterizzato da un incremento di 3,8 milioni di tonnellate (MT) nel 1999 e una successiva riduzione a 3,7 MT dal 2000 al 2001(29).

Le maggiori nazioni importatrici di tonno sono Thailandia, Cina e Spagna. Dagli inizi degli anni '60 il mercato Giapponese ha mostrato un crescente interesse per il tonno rosso e, attualmente, è arrivato ad assorbire circa la metà del prodotto pescato nazionale.

L'allevamento del tonno rosso, sperimentato inizialmente proprio da produttori giapponesi, negli ultimi decenni ha consentito di rispondere alla crescente richiesta di prodotti ad elevato tenore in grasso, maggiore rispetto a quello dei tonni selvatici, caratteristica essenziale per la preparazione di sushi e sashimi. In realtà non va considerato come allevamento, perchè non prevede alcuna fase riproduttiva, ma si basa

essenzialmente sul mantenimento in gabbia dei tonni per un periodo di circa 6-7 mesi, al fine di ingrassare i pesci durante la fase di finissaggio.

I tonni pescati mediante reti a circuizione, successivamente trasferiti in gabbie di trasporto, sono trasportati nel sito di allevamento, dove all'interno di gabbie vanno incontro a un primo periodo di acclimatazione, e, dopo circa un mese, a una fase di adattamento. L'alimentazione è costituita essenzialmente da pesce azzurro ad elevato contenuto calorico (17% contenuto lipidico medio). Una volta che i pesci raggiungono il giusto incremento ponderale (35-37 % del peso vivo) viene eseguita la mattanza mediante l'uso di fucili a proiettile ad espansione.





Tale scelta è dettata dall'esigenza di evitare eccessivo stress agli animali che indurrebbe la formazione di "hyake", tipica lesione da pesca.

Nella fase successiva il pesce, processato direttamente a bordo delle navi officine, viene lavorato e congelato o sbarcato in centri di lavorazione a terra.

Il tonno è una specie ittica di estrema importanza, non solo per la pesca ma anche per le industrie conserviere e di trasformazione. Infatti è commercializzato allo stato fresco e congelato come pure preparato e trasformato in una notevole varietà di prodotti, inclusi quelli ready-to-eat.

Le carni del tonno hanno colore rossastro e sono classificate come semigrasse e discretamente digeribili. La percentuale edibile si avvicina al 90% e 100 grammi di parte edibile di *Thunnus thynnus* contengono 21.5 g di proteine, 0.1g di carboidrati e 8.1g di lipidi, oltre ad un soddisfacente contenuto di vitamine (vit. A 450 µg, B1 0.2 mg,

B2 0.12 mg) e di sali minerali (calcio 38 mg , ferro 1.3mg, fosforo 264 mg, magnesio 26 mg) (INRAN 2006).

Per la sua composizione nutrizionale il tonno apporta numerosi benefici. E' ricco di acidi grassi omega-3 , il cui consumo si associa alla prevenzione delle patologie cardiocircolatorie (84). I tonni, inoltre, contengono fosforo e iodio necessari per una crescita bilanciata, proteine e vitamina B12, che aiutano la crescita delle cellule e niacina, che assicura un corretto metabolismo degli acidi grassi e del colesterolo.

Attualmente gran parte dei tonni mediterranei è allevata in gabbie, quindi il periodo di mantenimento consente di regolare le concentrazione dei suoi costituenti e di ottenere un prodotto con caratteristiche organolettiche e nutritive rispondenti alle esigenze di mercato.

Analogamente a quanto avviene per il suino, è possibile utilizzare tutte le sue parti, alcune particolarmente pregiate come quelle ricavate dalle masse

muscolari della regione addominale, denominate “ventresca”, ricche di grasso e quindi più morbide e di gusto caratteristico.

Il tonno, una volta pescato, giunge sulle nostre tavole come prodotto fresco, preparato (tranci), trasformato e nella forma più diffusa come conserva.

Inoltre particolari nicchie di mercato sono rappresentate da *prodotti derivati* dal tonno, ad esempio il “core”, cuore salato ed essiccato, “la tunnina”, tonno in salamoia, “scapece”, tonno lessato pronto per l’inscatolamento .

La bottarga è un tipico prodotto italiano ottenuto da ovaie salate e sottoposte a compressione. La lavorazione , per lo più artigianale, avviene in Sicilia e Sardegna. La salagione e la successiva compressione del prodotto elimina i liquidi plasmatici di estrazione osmotica. La membrana ovarica viene pertanto incisa a un’estremità e unta per non indurre una precoce e indesiderata essiccazione superficiale. Seguono poi le fasi di stagionatura e essiccazione, completate dall’aria in condizioni climatiche idonee. Il prodotto è infine conservato a temperatura di refrigerazione.

Meno conosciuto, ma molto apprezzato, è il *mosciame di tonno*, tipico prodotto sardo lavorato tra la seconda decade di maggio e la terza decade di giugno, quando i pescatori, dopo la mattanza, selezionano i tonni più grossi. Il filetto, che in gergo è chiamato *bodano*, è avviato alla fase di salagione per 24 ore mediante salamoia e poi sospeso in luoghi opportunamente ventilati. Il prodotto è modellato quotidianamente per 15 giorni fino ad ottenere una forma cilindrica. Viene consumato come bresaola, tagliato a fette sottili e condito con olio e limone.

Dal punto di vista della sicurezza alimentare il consumo di tonno è legato a problematiche sanitarie relative alla presenza, oltre che di ammine biogene, a quella di metalli pesanti, in particolare mercurio.

Per quanto riguarda la contaminazione degli alimenti da mercurio, essa deriva dall'inquinamento ambientale di origine industriale. Nelle acque superficiali gli organismi bentonici trasformano il mercurio inorganico nella forma organica. Il tonno, essendo predatore apicale e quindi ai vertici della catena trofica, può accumulare elevate concentrazioni di sostanze nocive. Tale fenomeno prende il nome di *biomagnificazione* e in pratica

comporta assimilazione di sostanze nocive ai livelli più bassi della catena trofica (fitoplancton e invertebrati) e accumulo lungo la catena trofica, fino a giungere ai livelli superiori e, quindi, al predatore apicale e all'uomo. La presenza di mercurio nel pesce causa danni nello sviluppo del sistema nervoso dei feti e dei bambini di età inferiore ai 6 mesi.

Per rispondere alle esigenze di gusto e di praticità d'uso dei consumatori e cercare di creare nicchie di mercato per prodotti innovativi, l'attuale tendenza delle industrie di trasformazione del tonno è quella di trattare il prodotto con tecnologie di lavorazione simili a quelle finora applicate alle carni rosse dei mammiferi domestici. In tal modo è possibile ottenere tipologie di alimento altamente innovative che possono rappresentare una valida alternativa di impiego della specie *Thunnus thynnus*.

Scopo del lavoro è stato quello di studiare le variazioni del profilo amminico in prodotti crudi e cotti a base di *Thunnus thynnus* sottoposti a differenti tipologie di salagione e a diverse modalità di affumicamento, di tipo tradizionale, in prodotti crudi salati e insaccati, e con aromi di fumo in prodotti cotti.

CAPITOLO IV

MATERIALI E METODI

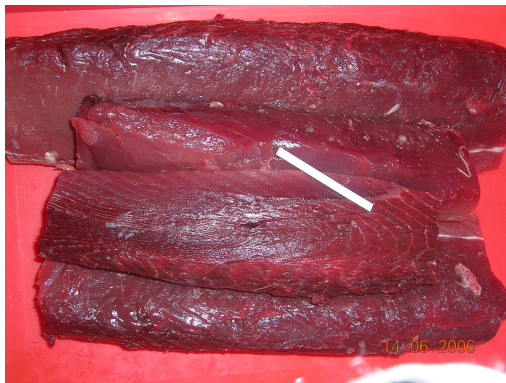
Le analisi sono state condotte su tre tipologie di prodotto:

- prodotti crudi , salati e affumicati
- prodotti crudi , insaccati e affumicati
- prodotti salati, affumicati, stampati e cotti

I **prodotti crudi, salati e affumicati** sono stati ottenuti da tagli muscolari interi delle regioni dorsali e ventrali dei tonni, sottoposti a salagione a secco.

La salagione è stata eseguita con una concia costituita da NaCl (6%), KNO₃ (15 g/kg), pepe bianco macinato (100g/100Kg). I tagli muscolari, adeguatamente toelettati, sono stati ricoperti da una parte di concia, posti in cella frigorifera a +3°C e quindi girati ogni due o tre giorni, aggiungendo di volta in volta la concia residua. Dopo 15 giorni di salagione sono stati lavati in abbondante salamoia al 30%, immessi in reticelle elastiche,

lasciati asciugare a temperatura ambiente (circa 20°C) per 48 ore e sottoposti ad un singolo ciclo di affumicamento tradizionale, con fumo prodotto per combustione di trucioli di faggio, della durata di 8 ore. Dopo ulteriore stagionatura a temperatura ambiente in cella di affumicamento per 15 o più giorni, in relazione al loro spessore, i prodotti sono stati puliti accuratamente con carta monouso, in parte tagliati in tranci , in parte confezionati sottovuoto, rispettivamente in buste Haflinger tipo S 145 e in buste POPPLASTBXH 15my/adesivo poliuretani/PE-PP-PE 110MY, e poi stoccati a T° 3°C.



filetti toelettati



salagione a secco



asciugatura



affumicamento



confezionamento sottovuoto
delle varie pezzature

I **prodotti crudi insaccati e affumicati** sono stati ottenuti con tessuto muscolare derivante dalla toelettatura dei tagli muscolari interi ventrali e dorsali e dallo spolpo delle restanti parti del tonno. Il tessuto muscolare è stato macinato a grana grossolana, addizionato della concia (NaCl 5% ; KNO₃ 0.015% , pepe bianco macinato 0.1%) e insaccato in budelli di collagene (fibran S.A.) calibro 55 mm.



tessuto muscolare residuo
da toelettatura e spolpo



macina



concia e budelli



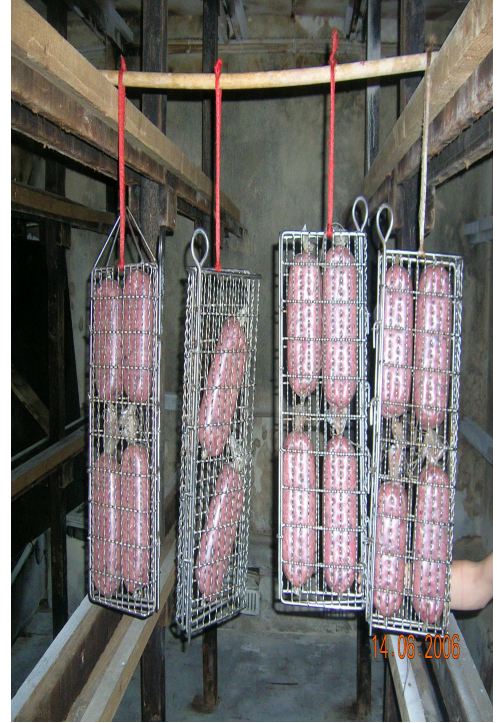
impasto manuale



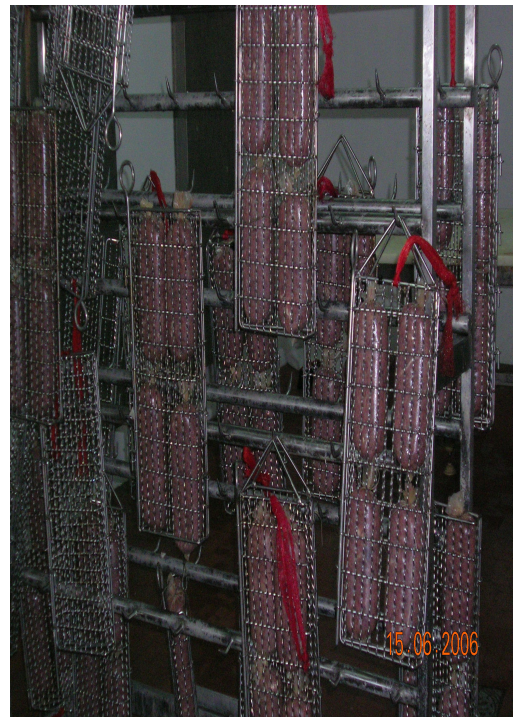
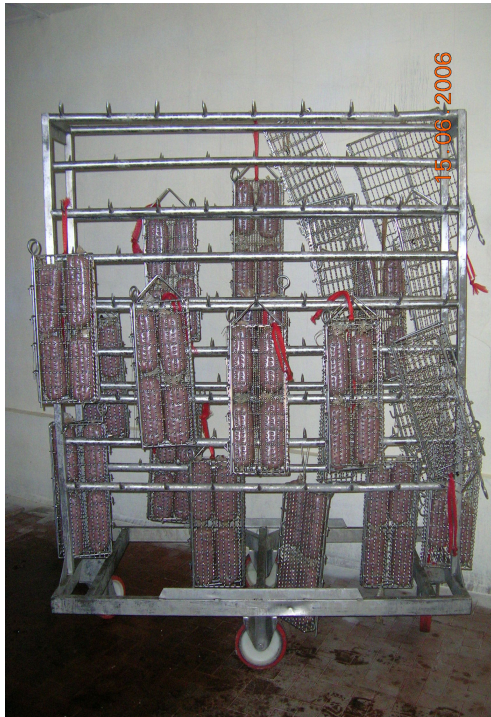
insaccamento



legatura e foratura dei budelli



asciugatura e stagionatura



asciugatura ed affumicamento

Gli insaccati sono stati collocati tra apposite griglie, tenuti per una notte a +3°C e quindi disposti tra due ripiani in pendenza e sottoposti a pressione a temperature ambiente (26-28°C) per tre giorni al fine di eliminare un maggior quantitativo di grasso e far legare meglio l'impasto. Sono stati quindi nuovamente posti su griglie , lasciati maturare alla stessa temperatura per 10 giorni e sottoposti , in due giorni successivi, a due cicli di affumicamento di 6-7 ore ciascuno. Analogamente ai prodotti salati , anche per questa tipologia è stato utilizzato l'affumicamento tradizionale, con fumo derivante dalla combustione di trucioli di faggio. Il giorno seguente i prodotti, opportunamente ripuliti con carta monouso, sono stati confezionati sottovuoto in buste HAFLINGER tipo S145 e mantenuti a 3° C per tutto il tempo delle analisi.



confezionamento



confezionamento

Per i **prodotti salati, affumicati, stampati e cotti** sono stati preparati due lotti, differenti per concentrazione della salamoia, l'uso o meno di polifosfati e per il sezionamento della materia prima.

I tonni utilizzati per il 1° lotto erano pervenuti 30 giorni prima al mercato ittico, dove erano stati eviscerati e congelati a -20°C . Al momento della lavorazione sono stati scongelati in acqua corrente e sezionati. I grossi muscoli dorsali e ventrali sono stati ridotti in pezzi cubici di circa 3 cm circa di lato e posti in un contenitore di acciaio inossidabile insieme a un

quantitativo di salamoia, pari al 20% del peso della carne, addizionato di aromi di carne cotta 5g /L H₂O, aromi spezie 5g /L H₂O nonché di NaCl 2.5%; destrosio 1.5% ; nitrito di sodio 0.015% e aroma di fumo in polvere 0.1% (EF fumo, Europrodotti S.p.A), rapportati al peso della carne . La vasca è stata successivamente posta in celle frigorifera a +3°C ed il tutto è stato rimescolato ad intervalli regolari, in modo da permettere alla carne di assorbire la salamoia. Dopo due giorni , assorbita completamente la salamoia, si è proceduto alla lavorazione suddividendo il muscolo in pezzi ancora più piccoli e eliminando le parti indesiderate, in particolare quelle connettivali.



tagli muscolari lavati in acqua corrente



sezionamento e salagione

La carne così lavorata è stata immessa in forme rivestite con un foglio di plastica, riempiendo tutti i vuoti e cercando di eliminare la maggior quantità di aria possibile.

Il contenuto è stato coperto con i fogli plastica e le forme sono state chiuse con gli appositi coperchi dotati di scanalature che permettono di pressare il contenuto.



stampi



pressatura

Le forme sono state quindi immerse in acqua in un contenitore e cotte con l'ausilio di un bruciatore a gas. La cottura è stata monitorata ad intervalli regolari con termometro a sonda ed ultimata nel momento in cui i prodotti avevano raggiunto a cuore una temperatura di 71°C.



cottura



raffreddamento in cella frigorifera

Subito dopo la cottura le forme sono state estratte dall'acqua, raffreddate con acqua corrente , ulteriormente pressate e poi stoccate in cella frigorifera a +3°C per una settimana.

Successivamente sono state aperte, è stato rimosso l'involucro plastico e si è proceduto dapprima a una toelettatura superficiale del prodotto, per rimuovere grasso e albumine coagulate e poi al confezionamento sottovuoto in buste HAFLINGER tipo S145.



prodotto finito prima del confezionamento

Nel 2° lotto sono state introdotte le seguenti varianti tecnologiche:

- a) si è utilizzato un quantitativo di salamoia pari al 25% del peso della carne, addizionata di aromi di carne cotta 5g/L H₂O, aromi di spezie 5g/L H₂O nonché 2.5%; destrosio 1.5%; NaNO₂ 0.015% ; polifosfati 1.5% e aroma di fumo 0.1%, rapportati al peso della carne ;
- b) la carne è stata tagliata in pezzi più piccoli dopo 48 h di salamoia
- c) è stata effettuata una cottura a cuore a +69°C
- d) non si sono pressati ulteriormente gli stampi dopo la cottura del prodotto.

Dopo tre giorni di refrigerazione i prodotti sono stati estratti dagli stampi, confezionati sottovuoto in buste HAFLINGER tipo S145 e stoccati secondo le medesime modalità del 1° lotto.

Tutti i prodotti, dopo il confezionamento, sono stati trasportati presso i laboratori della Sezione di Ispezione del Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti di Napoli e stoccati in frigorifero a + 3°C per tutta la durata della sperimentazione.



prodotto finito dopo il confezionamento

Determinazione ammine biogene

Le analisi, effettuate in doppio, sono state eseguite sui prodotti salati suddivisi in base al diverso calibro: grande (diametro 9,5 cm), medio (diametro 6,5 cm) e piccolo (diametro 4,5 cm); sugli insaccati del diametro di circa 5.0 cm e sui prodotti cotti.

L'estrazione del campione è stata condotta secondo la metodica di Porta et al.(1995) modificata.

REAGENTI – I solventi ed i reagenti utilizzati erano di grado analitico o per HPLC. E' stata utilizzata una miscela di 5 ammine (PUT,CAD, IST, SPD, SPR) (Sigma).

STRUMENTAZIONE – Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando un sistema HPLC Jasco con pompa quaternaria 2089 plus e un loop di 20 μ L, associato ad uno spettrofluorimetro Jasco 821-Fp.

E' stata utilizzata una colonna Luna 5 μm , 518 (250 mm x 4.6 mm i.d.) (Phoemenex).

ESTRAZIONE DEI PRODOTTI A BASE DI TONNO - A 10 g di

campione sono stati addizionati 10ml di PCA 0,2 M e il tutto è stato omogeneizzato in mixer in bagno ghiacciato. L'estratto centrifugato a 4000g per 20' e il surnatante, raccolto e suddiviso in aliquote di 2 ml, è stato successivamente centrifugato a 12.000 g per 10 min.

Un'aliquota di 100 μl dell'estratto amminico è stata fatta reagire con dansyl chloride e, dopo incubazione overnight a 25°C, si è proceduto ad un'estrazione con dietiletere. L'estratto è stato portato a secco sotto flusso di azoto, ricostituito con metanolo e separato cromatograficamente.

METODO CROMATOGRAFICO – Si iniettano 20 microlitri di

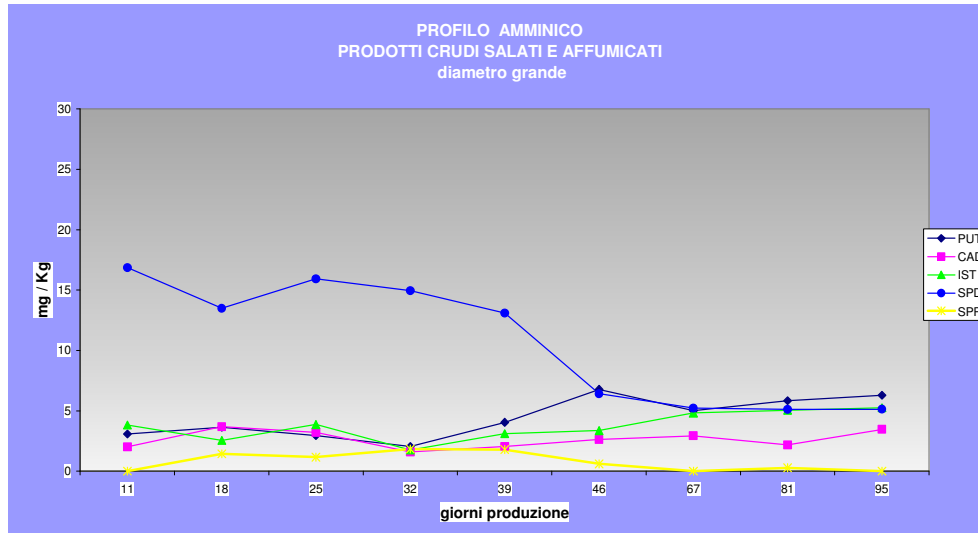
metanolo nel sistema HPLC/Fp. Si stabilisce un gradiente di eluizione

acqua:metanolo 35:65, programmato a raggiungere il 100% di metanolo in 20 minuti, al flusso di 0.8 ml/min.; ex 365 ; em 510.

CAPITOLO V

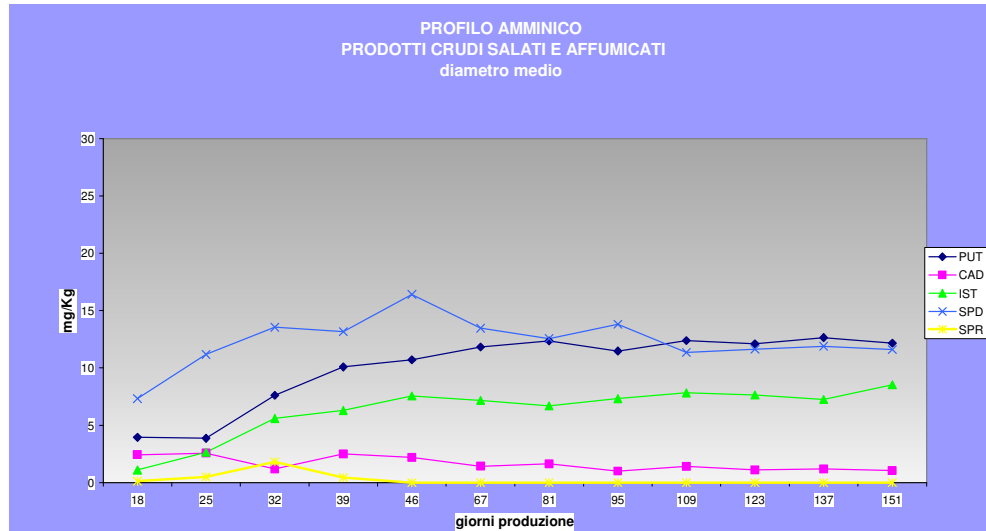
RISULTATI

PRODOTTI CRUDI SALATI E AFFUMICATI



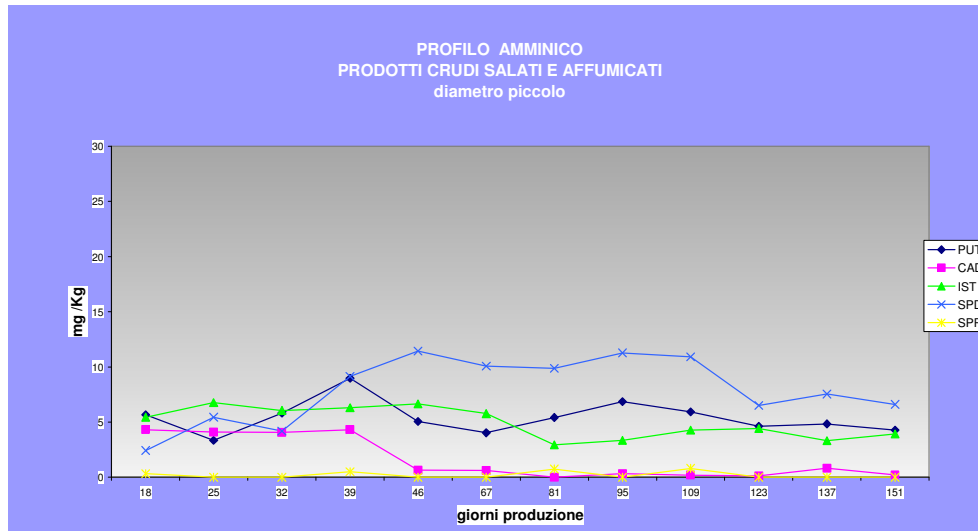
La determinazione del profilo amminico ha evidenziato nei prodotti di *diametro grande*, per i quali la sperimentazione è proseguita fino al 95° giorno dalla produzione, un trend in crescita dell'istamina, aumentata da valori iniziali di 3.82 mg/Kg fino a valori finali di 5.24 mg/Kg. La concentrazione di putrescina è raddoppiata (6.28 mg/Kg), mentre quella della cadaverina è lievemente aumentata (3.46 mg/Kg)

al 95° giorno di produzione. Spermidina e spermina hanno mostrato valori decrescenti di concentrazione.



I prodotti salati di *medio calibro* hanno evidenziato i maggiori livelli di istamina, compresi nel range di 1.1 - 8.53 mg/Kg. La concentrazione iniziale di putrescina è aumentata fino al valore finale di 12.16 mg/Kg, la cadaverina si è attestata a valori di 1.06 mg/Kg, la concentrazione di spermidina si è gradualmente ridotta, mentre quella

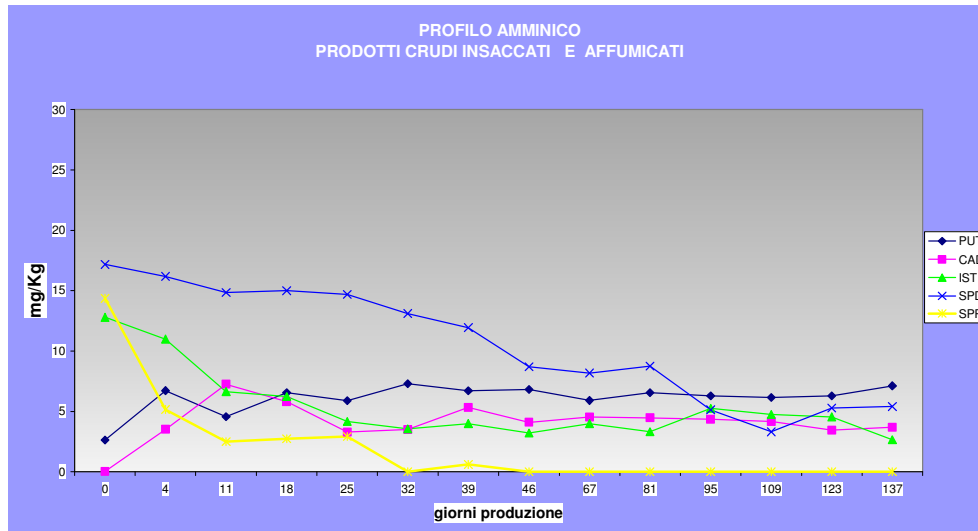
della spermidina è gradualmente aumentata per poi raggiungere 11.61 mg/Kg al termine delle analisi.



I dati relativi ai salati di *piccolo diametro* hanno evidenziato, invece, una riduzione sia dell'istamina, da valori di 5.45 a valori di 3.92 mg/Kg, sia della cadaverina , caratterizzata da valori finali inferiori all'unità (0.21 mg/Kg). La putrescina ha raggiunto concentrazioni finali di 4.28 mg/Kg, oscillando in un range molto ridotto, mentre la spermidina , dopo lievi aumenti di concentrazione compresi tra il 49°

ed il 109° giorno di produzione, si è attestata a valori di 6.61 mg/Kg a fine sperimentazione. La spermina è risultata assente al 151° giorno di produzione.

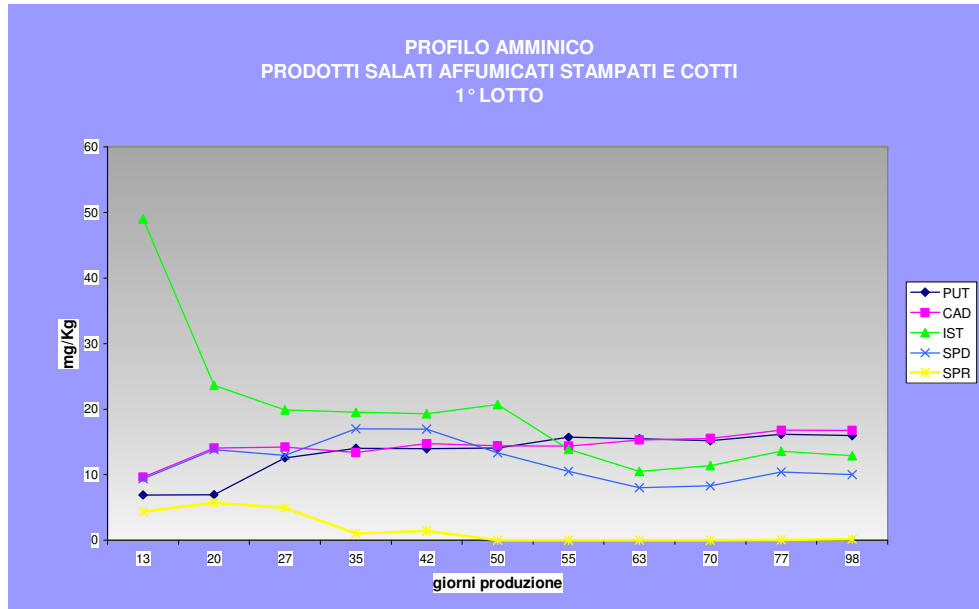
PRODOTTI CRUDI INSACCATI



Il profilo amminico dei prodotti crudi insaccati è stato caratterizzato da una graduale riduzione dei livelli di istamina che, da valori iniziali di 12.79 mg/Kg, si è attestata a 3.42 mg/Kg al 165° giorno dalla produzione. La putrescina e la cadaverina, ammine biogene che meglio definiscono il processo di stagionatura e la conservabilità degli

insaccati e dei salati ottenuti tradizionalmente da carni suine, hanno mostrato un lieve incremento finale attestandosi, rispettivamente, a valori di 6.33 e 3.99 mg/Kg al termine della sperimentazione. Spermidina e spermina, ammine di scarso significato ai fini della valutazione della conservabilità del prodotto, hanno mostrato valori decrescenti.

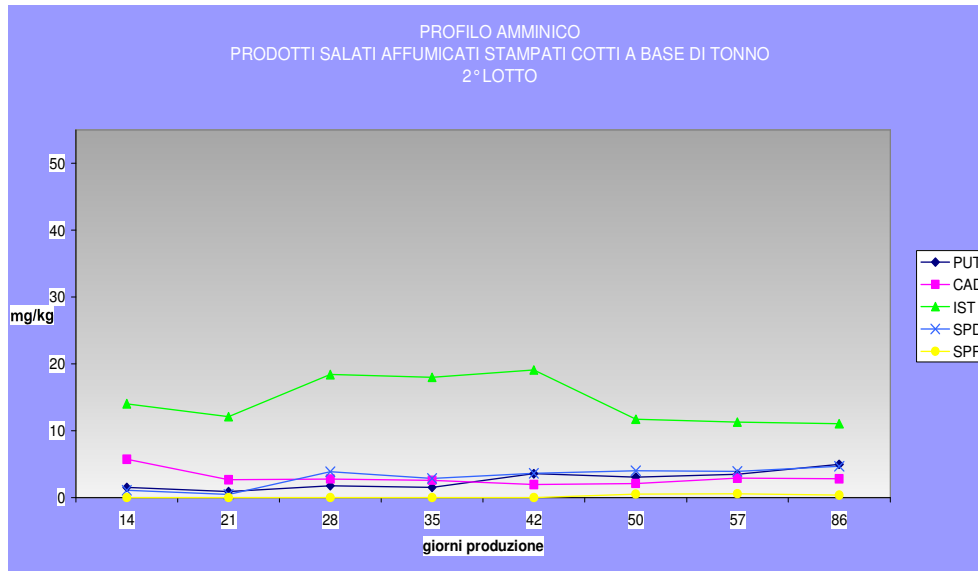
PRODOTTI SALATI, AFFUMICATI, STAMPATI E COTTI



Il profilo amminico ha presentato differenze nei due lotti.

Nei campioni del 1° lotto, il cui controllo è proseguito fino al 98° giorno, l'elevata concentrazione istaminica (49,20 mg/Kg) a 13 giorni dalla produzione, si è gradualmente ridotta fino a raggiungere il valore finale di 12.89 mg/Kg. I livelli iniziali di putrescina e cadaverina si sono raddoppiati attestandosi, rispettivamente a 15.99 e 16.75 mg/Kg, la concentrazione di spermidina ha oscillato mantenendosi prossima ai

valori di partenza (10.10 mg/Kg) mentre la spermina non è stata più rinvenuta a fine sperimentazione.



Nei campioni del 2° lotto, il cui controllo è proseguito fino all'86° giorno dalla produzione, sono stati rinvenuti modesti livelli di istamina al primo intervallo di analisi (14.30 mg/Kg), che si sono poi ulteriormente ridotti a 11.04 mg/Kg all'ultimo controllo. Le concentrazioni di putrescina, cadaverina e spermidina sono lievemente aumentate fino a raggiungere, rispettivamente, valori finali di 4.36,

2.81 e 4.69 mg/Kg , mentre la spermina è stata rinvenuta a valori di poco superiori allo zero al 98° giorno.

CAPITOLO VI

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Relativamente alla valutazione del profilo amminico, è da considerare che gli alimenti oggetto della presente ricerca sono stati ottenuti da carne di tonno, specie appartenente alla famiglia Scombridae, che insieme alle famiglie Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae, Scombresosidae, comprende pesci caratterizzati dalla presenza di carni rosse ad elevato contenuto di istidina , amminoacido precursore dell'ammina biogena istamina.

Il Regolamento CE n° 2073/05 fissa un limite per il contenuto di istamina pari a 100-200 mg/Kg nel tonno immesso sul mercato durante il periodo di conservabilità, mentre per i prodotti ottenuti dalle

stesse specie mediante fermentazione e trattamenti di salagione i limiti ammessi sono di 200-400 mg/Kg.

Nelle specie ittiche la produzione dell'istamina e delle ammine biogene è legata prevalentemente all'attività enzimatica di batteri decarbossilasi+ appartenenti alla flora autoctona del pesce e, successivamente alla cattura, anche alla flora batterica esogena. Le modalità di cattura, la corretta manipolazione dei prodotti e l'applicazione della catena del freddo, controllando la crescita batterica, ostacolano la produzione di ammine e possono limitarne l'aumento delle concentrazioni, comunque già presenti nel muscolo del pesce all'atto della cattura.

L'attività decarbossilasica è influenzata da diversi fattori. In primo luogo va considerato che la tecnologia di produzione può condizionare le variazioni del profilo amminico in funzione della capacità di

controllare e selezionare la flora batterica presente nel prodotto. Nel caso dei prodotti a base di tonno analizzati sia le modalità tecnologiche di produzione che quelle di confezionamento sottovuoto hanno determinato una attività decarbossilasica della flora presente, sostanzialmente modesta caratterizzando una produzione amminica molto ridotta.

Molti fattori hanno contribuito a contenere tale produzione. In primo luogo la concentrazione salina , in quanto la salagione a secco, avvenuta a concentrazioni del 6% e del 5%, rispettivamente nel caso dei prodotti crudi salati e negli insaccati, ha favorevolmente inibito l'attività enzimatica decarbossilasica. E' noto infatti che ridotte concentrazioni di NaCl (<3.5%) risultano favorevoli alla produzione amminica. Analogamente la salagione mediante salamoia al 2% pari al 20% del peso della carne (1° lotto) e al 25% del peso della carne (2°

lotto), nel caso dei prodotti a base di tonno cotti, ha efficacemente contrastato la produzione di elevate concentrazioni di ammine nel corso della conservazione.

In secondo luogo hanno inciso i valori di temperatura della materia prima, prontamente refrigerata (+3°C) nel caso dei prodotti crudi salati e insaccati, e congelata (-20°C) per i cotti, dato che l'optimum dell'attività decarbossilasica è compreso tra di 20° - 38 ° C . Infine lo stoccaggio dei prodotti a +3°C ha consentito il mantenimento del risultato raggiunto.

Per quanto riguarda i valori di pH (prossimi sempre a un valore medio 6), questi hanno agito in sinergia con i precedenti fattori ostacolando la crescita di specie batteriche ammino- positive.

Infine il sottovuoto, riducendo la concentrazione di ossigeno, ha inibito l'attività decarbossilasica in tutte le tipologie di prodotti.

Nella fase di maturazione dei prodotti carnei stagionati la proteolisi libera amminoacidi e nella sua evoluzione determina un profilo amminico caratteristico per le diverse tipologie di prodotto. Le variazioni del profilo amminico dei prodotti a base di tonno crudi insaccati e salati, se confrontate con quelle del profilo dei corrispondenti prodotti carnei, nel loro complesso mostrano il tipico andamento delle concentrazioni amminiche nel corso dei processi fermentativi che caratterizzano le fasi di maturazione e stagionatura. In particolare, ad eccezione dei salati di medio calibro in cui si è registrato un leggero trend di crescita per la SPD, il profilo amminico dei prodotti crudi nel corso della conservazione è stato caratterizzato dal progressivo decremento dei livelli di SPR ed SPD e tendenzialmente da un aumento di quelli delle altre ammine,

confermando i dati relativi allo stoccaggio dei corrispondenti prodotti carnei.

Come è noto le ammine sono termoresistenti, pertanto i trattamenti termici applicati ai prodotti a base di tonno cotti non hanno condizionato i livelli amminici presenti in corso di produzione.

Viceversa in fase di stoccaggio l'applicazione delle temperature di refrigerazione è stata determinante nel controllo della produzione amminica. Le variazioni del profilo amminico nei prodotti del 1° e del 2° lotto sono principalmente riferibili alle differenti modalità tecnologiche di produzione, che hanno condizionato un profilo con maggiori oscillazioni dei livelli di ammine nel caso del 1° lotto e più uniforme nel 2° lotto, nel quale anche le concentrazioni delle diverse ammine, registrate nei singoli intervalli, sono risultate più ridotte.

L'istamina possiede un'azione biologica legata alle sue proprietà vaso-attive. L'ingestione di alimenti contenenti piccole quantità di IST non produce effetti tossici gravi nell'uomo, mentre l'ingestione di maggiori quantità dell'ammina può indurre crisi istaminergiche in soggetti sensibili con basso livello soglia o in soggetti che, per cause diverse, presentano difetti dei sistemi di detossificazione. A livello del tratto gastrointestinale gli enzimi DAO e l'istamino-N-metiltransferase (HMT) convertono l'ammina in prodotti della degradazione non più tossici.

In presenza di elevate concentrazioni di IST, la capacità di detossificazione dei due enzimi risulta limitata e induce effetti tossici nel momento in cui l'ammina entra in circolo. La sintomatologia si manifesta con rapida comparsa dopo il pasto ed è caratterizzata da nausea, vomito, crampi addominali, diarrea, sensazione di irritazione

della mucosa buccale, rash cutanei, orticaria, ipotensione, palpitazioni, fino allo shock anafilattico. PUT e CAD, SPD ed SPR, pur non mostrando azioni biologiche, essendo contemporaneamente presenti nell'alimento, impegnano i sistemi enzimatici intestinali, e potenziano la tossicità dell'IST. Infatti, se le loro concentrazioni sono pari a cinque volte quella dell'istamina (Lehan et al.,2000) se presenti, possono aumentare la tossicità dell'IST.

L'IST può formarsi nei prodotti a base di pesce nelle diverse fasi intercorrenti presenti tra la cattura ed il consumo. Prodotti che contengono 500-1000 mg/Kg , o livelli superiori, sono ritenuti tossici e causano episodi tossinfettivi riferibili alla Scombroid fish poisoning.

Tale sindrome si ritiene sia causa di almeno il 50% di casi di intossicazioni alimentari in USA e nel Regno Unito (Taylor,1986; Gillespie et al.,2001; CSPI,2004). Ma anche in Europa segnalazioni di

allerta nel 2004 hanno riguardato casi di intossicazione in seguito al consumo di tonno fresco commercializzato da produttori olandesi, che avevano importato il prodotto da Paesi asiatici (Indonesia n° di casi 49%; Sri Lanka 5,1%;) o anche per il consumo di tonni di provenienza olandese (3,4%) e altri Paesi europei (42%) (Griglio et al.,2005). Tonno fresco confezionato sottovuoto è stato implicato nel 50% dei casi di intossicazione segnalati nel Regno Unito nel 1996 ed in molti casi riscontrati nel Nord America (Todd,1997; Scoging,1998).

L'attività dell'enzima istidino-decarbossilasi è in funzione di diversi fattori, in particolare la temperatura, le modalità di confezionamento ed il contenuto di istidina libera del substrato, che incidono sulla produzione dell'ammina. Sebbene concentrazioni tossiche dell'ammina si riscontrino più frequentemente in prodotti ittici

stoccati sperimentalmente a 7-10° C, livelli tossici si osservano anche in prodotti a base di pesce conservati tra 0° e 4°C (Silva et al., 1998).

In letteratura non sono presenti molti dati relativi a tonno affumicato e confezionato sottovuoto, comunque un singolo caso accertato e due episodi di tossinfezione associati a questo prodotto si sono registrati in Danimarca durante il 2004. Il processo di affumicamento a freddo di filetti di tonno è simile a quello utilizzato per il salmone affumicato. Ma, a differenza del salmone Atlantico (*Salmo salar*) che ha un ridotto contenuto di istidina libera, i filetti di tonno affumicato possono contenerne livelli elevati, generalmente superiori a 10.000 mg/Kg(Emborg et al.,2005).

Nel caso dei prodotti a base di tonno crudi e cotti analizzati, nonostante la ricchezza di istidina del substrato, i livelli di istamina sono sempre stati di molto inferiori al limite normativo, grazie

soprattutto all'azione delle temperature di refrigerazione utilizzate nello stoccaggio, sicuramente inferiori al valore ottimale di produzione dell'istamina prossimo a 38° C.

La shelf life di un prodotto individua il periodo di tempo nel quale, a determinate condizioni di stoccaggio, l'alimento preserva le sue caratteristiche di qualità e sicurezza. In tale periodo deve pertanto conservare le sue proprietà sensoriali, nutrizionali, funzionali e microbiologiche (IFST, 1993).

Per avere garanzie di sicurezza e qualità è necessario un controllo di filiera.

Nella produzione di alimenti insaccati e salati, è fondamentale la scelta di una materia prima ineccepibile dal punto di vista qualitativo, il rispetto delle norme di igiene durante le fasi tecnologiche e il controllo dei parametri di processo. Nel caso dei prodotti a base di

Thunnus thynnus analizzati , in particolare, è necessario sia ridurre i tempi in cui il prodotto può raggiungere condizioni ottimali per l'attività decarbossilasica batterica e, quindi, per la produzione di istamina, sia monitorare parametri come pH, concentrazione salina e concentrazione di ossigeno, che possono efficacemente controllare l'incremento delle concentrazioni dell'ammina e indicano che il processo tecnologico ha assicurato il mantenimento di concentrazioni di istamina a valori inferiori a quelli previsti dal limite normativo ed ostacolato la formazione delle altre ammine. Osservazione analoga può essere fatta per i prodotti cotti. Nel 2° lotto, in particolare, l'uso di maggiori quantitativi di salamoia e di polifosfati e la riduzione della carne in pezzi più piccoli hanno favorito una più veloce penetrazione salina e, riducendo l' a_w , hanno ostacolato la crescita batterica nel

prodotto e mantenuto a livelli non significativi la produzione delle
ammine.

BIBLIOGRAFIA

1. Bardòcz S., (October 1995), Polyamine and their consequences for food qualità and human health, Trends in Food Science & Technology, (Vol.6), pp. 341-346.
2. Rice S.L., Eitenmiller R.R., Koehler P.E., (1976), Biologically active amines in food: a review, J Milk Food Technol., 39 (5), pp. 353-358.
3. Marinè-Font A., Vidal-Carou C., Izquierdo-Pulido M., Veciana-Noguès T., Herandez-Jover T., (Avril-Mai- Juin 1995), Les amines biogenes dans les aliments: leur signification, leur analyse, Ann. Fals. Exp. Chim.,88- N° 931, pp. 119-140.
4. Smith t.A., (1980-81), Amines in Food, Food Chem.,6, pp. 169-200.
5. Maxa E., Brandes W., (1993), Biogenie amine in fruchtsallen, Mitteilungen Klosterneuburg, 43, pp. 101-106.

6. Pfundstein B., Tricker A.R., Preussmann R., (1991), Determination of primary and secondary amines in foodstuffs using GC and chemiluminescence detection with a modified thermal energy analyser, *J. Chromato.*, 539, pp. 141-148.
7. Ten Brink B., Damink C., Joosten H.M.L.J., Huis in't Veld J.H.J., (1990), Occurance and formation of biologically amines in food, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 11, pp. 73-84.
8. Shalaby A.R., (1996), Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International*, 29, pp. 675-690.
9. Joosten H.M.L.J., (1988), The biogenic amine contents of Dutch Cheese and their toxicological significance, *Neth. MilkDairy J.*, 42, pp. 247-258.
10. Tiecco G., Tantillo G., Francioso E., Paparella A., De Natale G., (1986), Ricerca quali-quantitativa di alcune amine biogene in

insaccati nel corso della stagionatura, *Industrie alimentari*, Volume 5, pp. 209-213.

11. Gale E.F., (1946), The bacterial amino acid decarboxylase, *Advances in Enzymology*, Volume 6, pp.1-32.
12. Edwards, S.T., Sandine, S.L., (1981), Public health significance of amine in cheese, *Journal of Dairy Science*, Volume 64, pp. 2431-2438.
13. Mitchell P., (1969), Chemiosmotic coupling and energy transduction, *Bodulin Glynn Research*.
14. Wil. N. Konings, Mazurkiewicz P., Poela Rends G.J., (2002), Membrane transport, structure, function, and biogenesis, *Journal of Biological Chemistry*, (29), pp. 26081-26088.
15. Rodriguez-Jerez, J.J, Colavita G., Giaccone V., Parisi E., (1994), *Bacillus macerans*, a new potential histamine producing bacteria isolated from Italian cheese, *Food Microbiology*, Volume 11, pp. 409-415.

16. Morii, H., Cann D.C., Taylor L.Y., (1988), Histamine formation by luminous bacteria in mackares stored at low temperature, *Nippon Suisan Gakkaishi*, Volume 54, pp.299-305.
17. Jorgensen, L.V., Huss H.H., Dalgaard P., (2000), The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 89, pp.920-934.
18. Roig-Saguès, A.X., Hernandez- Herrero M., Lopez-Sabater E.I., Rodriguez-Jerez J.J., Mora- Ventura M.T., (1996), Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened Salsichon, a Spanish cured sausage, *Journal of Food Protection*, Volume 59, pp.516-520.
19. Marino M., Maifreni M., Moret S., Rondinini G., (2000), The capacity of Enterobacteriaceae to produce biogenic amines in cheese, *Letters in Applied Microbiology*, Volume 31, pp.169-173.

20. Martuscelli M., Crudele M.A., Gardini F., Suzzi G., (2000),
Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus*
xylosus strains from artisanal fermented sausages, Letters in
Applied Microbiology, Volume 31, pp. 228-232.
21. Silla- Santos M.H., (1998), Amino acid decarboxylase capability
of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products,
International Journal Food Microbiology, Volume 39, pp. 227-230.
22. Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C., (2000),
Changes in biogenic amine and polyamine content in slightly
fermented sausages manufactured with and without sugar, Meat
Science, Volume 57, pp. 215-221.
23. Bover-Cid S., Hugas M., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C.,
(2001), Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated
from fermented pork sausages, International Journal of Food
Microbiology, Volume 66, pp. 185-189.

24. Straub, B.W., Kicherer M., Schilcher S.M., Hammes W.P., (1995),
The formation of biogenic amines by fermentation organisms,
Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 201, pp.
79-82.
25. Masson, F., Talon R., Montel M.C., (1996), Histamine and
tyramine production by bacteria from meat products, International
Journal of Food Microbiology, Volume 32, pp. 199-207.
26. Montel M.C., Masson F., Talon R., (1999), Comparison of
biogenic amine content in traditional and industrial French dry
sausages, Sciences des Aliments, Volume 19, pp.251-254.
27. Halasz A., Barath A., Simon-Sankadi L., Holzappel W., (1994),
Biogenic amines and their production by microorganisms in food,
Trends in Food Science & Technology,.
28. Wendakoon C. N. and M. Sakaguchi., (1993), Combined effect of
sodium chloride and clove on growth and biogenic amine

formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract, J. Food Prot. 56 (5), pp.410-413.

29. Ababouch L., Afifal M.E., Benabdel Jelili H., Fusta F.F., (1991), Qualitative changes in bacteria aminoacids and biogenic amines in *Sardina pilchardus* stored at ambient temperature (25-28°C) and ice, International Journal Food Science Technology, Volume 26, pp.297-306.

30. Vidal-Carou M.C., Izquierdo-Pulido M., Martin-Morro M.C., Marinè-Font A., (1990), Histamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage, Food Chemistry, Volume 37, pp. 239-249.

31. Joosten H.M.L.J. and Stadhouders, J., (1987), Conditions allowing the Formation of Biogenic Amine in Cheese: 1. Decarboxylative Properties of Starter Bacteria, Neth Milk Dairy J., 41(3), pp.247-258.

32. Diaz-Cinco, M.E., Fraijo G., Grajeda P., Lozano-Taylor S., Gonzalezde Meja E., (1992), Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationships to histamine, *Journal of Food Science*, 57, pp. 355-365.
33. Lonvaud- Funel A., Biogenic amines in wines: role of lactic and bacteria, *FEMS. Microbiology Letters*
34. Eituenmiller R.R., De Souza S., (1984), Enzymatic mechanism for amine formation in fish, in *Seafood Toxins.*, E.R. Ragelis, American Chemical Society, Washington, DC.
35. A E Pegg, (1986), Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes, *Biochem. J.*, 234, pp.249-262.
36. Jamne J., Poso H., Raina A., (1978), *Bioch. Biophys. Acta*, 473, pp. 241-293.
37. Bardòcz S., (1993), The role of dietary polyamines, *European Journal of Chiminal Nutrition*, Volume 47, pp. 683-690.

38. Marmo E., (1991), *Farmacologia Generale e Speciale*, Ed. UTET,
Cap. 13°, pp. 497-782.
39. Stratton J. and S. Taylor., (1991), Scombroid poisoning., In
Microbiology of Marine Food Products (D. Ward and C. Hackney,
eds.), pp. 1333-1344. Van Nostrand Reinhold, NY.
40. McCabe BJ., (Aug 1986), Dietary tyramine and other pressor
amines in MAOI regimens: a review, *J Am Diet Assoc.*, (8),
pp.1059-1064.
41. Silla-Santos M.H., (1996), Biogenic amines in fish and shellfish,
Int. J. Food Microbiology, 29, pp.213-231.
42. Carniel A., Bortolin M., Franchin L., Bresin B., (2000), Presenza
di amine biogene a diversi stadi di maturazione del formaggio
Montasio, *Boll. Chim. Igien.*, vol. 51, pag. 289-296.
43. Finoli C., Vecchio A., Galli A., (Gennaio 2001), Presenza di amine
biogene in formaggi, *Industrie alimentari*, XL, pp.15-26.

44. Cerutti G., Carini S., Zappavigna R., Lodi R., Ribalzi C., (1975),
Produzione di istamina e di tiramina nel corso della maturazione
del formaggio Taleggio, *Latte*, 49, pp.305-310.
45. Moret S., Bortolomeazzi R., Feruglio M., Leicker G., (1992),
Amine biogeniche in formaggi italiani, *Sci Tecn. Latt. Cas.*, 43,
pp.187-198.
46. Martelli A., Arlorio M., Tourn M.L., (1993), Determination of
amines and precursor amino acids in Gorgonzola cheese by ion-
pair HPLC without derivatization, *Riv. Sci. Ali.*, 22, pp.261-270.
47. Bonafaccia G., Quaglia G.B., Zanasi F., (1994), Contenuto in
istamina in formaggi di produzione italiana ed estera,
Riv.Sci.Alim., 23, pp.367-371.
48. Cerutti G., Cecchi L., Brasca M., Manera E., Patta F., (1994),
Biogenesi delle amine nella conservazione dei formaggi, *Riv. Sci.
Ali.*, 23, pp.441-452.

49. Lanza C.M., Russo C., Tomaselli F., (1994), Amine biogene come parametro di qualità igienica dei formaggi tipici siciliani, *Latte*, 19, pp.390-393.
50. Antolini F., Franciosini S., Floridi A.L., Floridi A., Ani on pair HPLC method for the determination of istamine, tyramine , tryptamine, β -phenilethylamine and their amino acid precursors in cheese for industrial purpose.
51. Dellano D.G., Cuesta R., Rodriguez A., (1998), Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains, *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, pp.270-274.
52. Giraffa G., Carminati D., Neviani E., (1997), Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use, *J. Food Prot.*, 60, pp.732-738.
53. Leushner R.G.K., Kurihara R., Hammes W.P., (1998), Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by

lactobacilli during Gouda cheese ripening, *International J. Food Microbiol.* 44, pp.15-20.

54. Krause I., Bockhardt A., Klostermeyer H., (1997), Characterization of cheese ripening by free amino acids and biogenic amines and influence of bactofugation and heat-treatment of milk, *Lait*, 77, pp.101-108.

55. Novella-Rodriguez S., Veciana-Nogues MT., Roig-Sagues AX., Trujillo-Mesa AJ., Vidal-Carou MC., (May 2004), Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk, *J Dairy Res*, (2), pp.245-252.

56. Bardocz S., Duguid TJ., Brown D.S., Grant G., Pusztai A., White A., Ralph A., (1995), *Br. J. Nutr.* 73, pp.819-828.

57. Yamanaka H.K., Shimakura K., Shipmi K., Kikuchi T., (1986), *Bull Jpn Soc. Fish.*, 52, p.127.

58. Ababouch I., Afilal M.E., Benabdeljelil H., Fusta F.F., *Int. J. Food Sci. Technol.*, 6, 34, (1995)
59. Mietz J.L., Karmas E. J., (1977), *Food Sci.*, 42, p.155.
60. UNIPROM (Consorzio Promozione Prodotti Ittici), “Indagine internazionale per l’individuazione di tecnologie e tecniche innovative relative ai prodotti ittici”.
61. Cattaneo P., d’Aubert S., Cantoni C., Gamaraschi V., Bersani C., (1984), *Industrie alimentari*, 23, p.510.
62. Lebiedzinska A., Lamparczyk H., Ganowiak Z., Eller K.I.Z, (1991), *Lebensm. Unters Forsch.*, 192, p.240.
63. Giordano L., (Ottobre 2004), Il confezionamento dei prodotti ittici in atmosfera modificata, *Il Pesce*.
64. N. Sayem el-Daher, R.E. Simart, J.Fillion, and A.G. Roberge, (1984), Extraction and determination of biogenic amines in ground beef and their relation to microbial quality, *Food Science Technology*, 17, pp.20-23.

65. Hernandez-Jover T., Izquierdo-Pulido M., Veciana-Nogues M.T.,
Marinè Font A., Vidal-Carou M.C., (1997), Biogenic amine and
polyamine contents in meat and meat products, *Journal of
Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp.2098-2102.
66. Bover-Cid S., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Caron M.C., (2000),
Influence of hygienic qualità of raw material on biogenic amine
production during ripening and storage of dry fermented sausages,
Journal of Food Protection 63, pp.1544-1550.
67. Vinci G., Antonelli M.L., (2002), Biogenic amines: qualità index
of freshness in red and white meat, *Food Control*, 13, pp.519-524.
68. Cappelli P., Vanucchi V., (1998), Carne, In *Chimica degli
Alimenti*, Bologna: Zanichelli, p.5.
69. Suzzi G., Gardini F., (2003), Biogenic amines in dry fermented
sausages: a review, *International Journal of Food Microbiology*,
88, pp.41-54.

70. Parente E., Martuscelli M., Gardini F., Grieco S., Crudele M.A.,
Suzzi G., (2001), Evolution of microbial populations and biogenic
amine production in dry sausages produced in Southern Italy,
Journal of Applied Microbiology, 90, pp.882-891.
71. Halász A., Baràth A., Simon-Sarkadi L., Holzapfel W., (1994),
Biogenic amines and their production by micro-organisms in food,
Trends in Food Science & Technology, Volume 5, pp.42-48.
72. Silla Santos M.H., (1996), Biogenic amines: their importance in
foods, International Journal Food Microbiology, Volume 29,
pp.213-231.
73. Ordonez J.A., Hierro E.M., Bruna J.M., de la Hoz L., (1999),
Changes in the components of dry-fermented sausages during
ripening-critical, Review in Food Science and Nutrition, Volume
39, pp.329-367.
74. DeKetelaere A., Demeyer D.I., Vanderkerhove P., Verveake L.,
(1974), Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry

sausage ripening, Journal of Food Science, Volume 39, pp.297-300.

75. Hammes W.P., Hertel C., (1996), Selection and improvement of lactic acid bacteria used in meat and sausage fermentation, Lait, Volume 76, pp.159-168.

76. Henry Chin K. D., Kochler P. E., (1986), Effects of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenethylamine, tryptamine and tyramine during miso fermentation, Journal of Food Protection, 49, pp.423-427.

77. Cantoni C., Bersani C., Damenis L., Comi G., (1994), Amine biogene negli insaccati crudi stagionati, Industrie Alimentari, Volume 23, pp.1239-1243.

78. Moret S., Conte L.S., Dipartimento di Scienze degli Alimenti. Università degli Studi di Udine. Relazione presentata al Convegno Lab 2000 Food di Como.

79. Marinè-Font A., (1978), Alimentos y medicamentos. Interacciones,
3a parte Circ.farm., 258, pp.43-61.
80. Tailor S.A., Shulman K.L., Walzer S.E., Mass J., Gardner D.,
(1994), Journal Clin. Psychopharmacol, 14, 5.
81. Hyman SE, Arana GW, Rosenbaum JF, Handbook of Psychiatric
Drug Therapy
82. Rindi G., Manni E., (1990), Fisiologia Umana, UTET, V
edizione, Volume I e II.
83. Palese L., Palese A. (1992) Il controllo sanitario e qualitative dei
prodotti alimentari della pesca (ed. Piccin)

