





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

*SCUOLA DI DOTTORATO IN*  
***SCIENZE VETERINARIE***  
Direttore: Prof. Sergio Ledda

*INDIRIZZO: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare (XXVII CICLO)*  
Coordinatore: Prof. Enrico De Santis

## **Studio sulla variabilità di composti bioattivi in latte e formaggi prodotti in Sardegna**

**Docente Guida**  
**Prof.ssa Gavina Manca**

**Direttore**  
**Prof. Sergio Ledda**

**Tesi di dottorato della**  
**Dr.ssa Arianna Porcu**

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

*La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Sassari - XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1.*



## INDICE

INTRODUZIONE	1
SCOPO DELLA TESI	8
LA TAURINA	11
IL GABA	18
LE AMMINE BIOGENE	25
MATERIALI E METODI	61
RISULTAI E DISCUSSIONI	71
CONCLUSIONI	93
BIBLIOGRAFIA	96



## **INTRODUZIONE**

È un fatto ampiamente riconosciuto che oggi sia possibile ridurre il rischio di malattie e conservare la propria salute e il benessere con uno stile di vita sano, che includa anche un'alimentazione corretta.

In questi ultimi anni infatti, la maggior consapevolezza da parte del consumatore dell'importante ruolo che ha la dieta nel mantenimento di un livello di salute ottimale e nella prevenzione di specifiche patologie legate agli squilibri dietetici (obesità, ipertensione, osteoporosi, diabete, patologie cardiovascolari, ecc.), ha determinato lo sviluppo del mercato degli alimenti funzionali e nutraceutici (Mollet et al., 2002).

In generale, vengono considerati funzionali quegli alimenti che, grazie a particolari sostanze naturalmente presenti o ad essi addizionate, sono in grado di conferire specifici effetti benefici sulla salute, aldilà degli effetti nutrizionali normali (Niva et al., 2007), e pertanto, possono essere visti come un'alternativa pratica, più naturale e meno dannosa in termini di "effetti collaterali", ai farmaci (Cranfield et al., 2011).

Allo scopo di soddisfare le esigenze di consumatori, sempre più attenti alla salubrità della loro dieta, un numero considerevole di aziende operanti nel settore alimentare sta investendo le proprie risorse nella ricerca scientifica e biotecnologica per sviluppare cibi funzionali (Zoltán, 2012).

Numerosi progetti finanziati dall'Unione Europea hanno portato all'identificazione e alla comprensione del meccanismo d'azione di componenti biologicamente attivi nel cibo, i quali possono influire positivamente sulla salute e persino ridurre il rischio di alcune malattie metaboliche (Annunziata et al., 2010).

L'interesse della scienza e, conseguentemente, dell'industria per la progettazione di alimenti arricchiti di molecole bioattive e/o impoveriti di

sostanze antinutrizionali o dannose per la salute umana è cresciuto considerevolmente.

Il mercato di questi alimenti sta mostrando livelli di crescita notevolmente superiori addirittura a quelli del tradizionale mercato di alimenti trasformati. Attualmente i principali mercati per il settore degli alimenti funzionali sono gli Stati Uniti, il Giappone, il Canada e l'Unione Europea, ovvero i Paesi in cui la commercializzazione degli alimenti funzionali è iniziata già a partire dalla fine degli anni '80 (del secolo scorso).

Nel 2012 il mercato degli alimenti funzionali in termini di ricavi di vendita, ha rappresentato circa l'11% del ricavo complessivo mondiale per la categoria dei “*packaged food*” (ovvero, “cibi confezionati”) (*Euromonitor*, 2012), Le vendite di tali alimenti in Europa sono cresciute significativamente nel corso degli ultimi anni (Jago et al., 2009; Annunziata et al., 2011) e, secondo le stime di *Euromonitor*, ci sarà un'ulteriore aumento delle vendite di *functional food* nel prossimo futuro.

In Italia i prodotti funzionali stanno avendo sempre un maggiore successo grazie alla recente introduzione di nuove direttive dell'Unione Europea che hanno avuto l'effetto di aumentare il livello di fiducia degli italiani nell'etichettatura dei prodotti, in cui vengono riportate le informazioni validate su base scientifica delle virtù nutrizionali e salutistiche degli alimenti. Al momento il mercato italiano di questi alimenti è dominato dalle grandi multinazionali, che possono permettersi grossi investimenti in termini di ricerca e sviluppo e marketing, tuttavia c'è un crescente numero di piccole compagnie italiane che si stanno concentrando su prodotti specifici per determinati bisogni salutistici, e stanno ottenendo importanti risultati (Annunziata et al, 2010). La maggior parte del mercato (81%) fa



riferimento a tre tipologie di alimenti: una minore parte è rappresentato da bevande ed energy drinks (19,6%), mentre occupano uno spazio di rilievo i latticini, una quota pari al 46,8% è rappresentata da latte fermentato, e il 15% dal latte arricchito con nutrienti funzionali (Özer et al., 2010).

Il latte e i prodotti lattiero-caseari vengono spesso considerati dei “functional foods” naturali, dal momento che contengono molti componenti di natura diversa importanti nel ridurre il rischio di certe malattie e disturbi. Oltre agli ormai noti probiotici e prebiotici per il benessere della flora batterica e dell'intestino, si stanno studiando sempre più i composti bioattivi che possono avere effetti benefici sulla salute umana. Questi costituenti possono essere naturalmente presenti nei cibi o formarsi durante i processi di trasformazione ad opera di specifici microrganismi (Mills et al. 2009).

Una sostanza bioattiva che sta riscuotendo un certo interesse è la taurina la cui popolarità è cresciuta a causa del suo utilizzo come supplemento ed ingrediente delle bevande energetiche (Giles et al. 2012).

La taurina (acido 2-ammino-etan-solfonico) è spesso definita come un aminoacido “non essenziale”, o più generosamente come un aminoacido “condizionatamente essenziale” per l'uomo e per i primati, ma questi sono chiaramente termini impropri considerando le attività svolte da questo composto nei mammiferi (Sturman 1993).

Senza dubbio è una delle sostanze più essenziali nel corpo e, sebbene possa essere sintetizzata dagli aminoacidi solfonici, la produzione endogena è insufficiente per l'organismo umano, pertanto è necessario introdurre questo nutriente importantissimo attraverso la dieta. Sono fonti di taurina oltre alla carne, il pollame, il pesce anche il latte ed i prodotti lattiero-

caseari. La taurina è contenuta nel latte di un gran numero di specie animali; il latte umano presenta contenuti di ca. 5,2 mg/100g ed è quello che ne contiene in maggior quantità, mentre il latte di vacca presenta livelli di ca. 0,2 mg/100g (Tripaldi et al 1998; Csapo e Salamon 2009). Nel latte di capra il contenuto è molto simile a quello riscontrato nel latte umano. La razza Maltese è quella che presenta il contenuto medio più elevato, pari a ca. 11 mg/100g e la Saanen quella con i quantitativi più bassi, pari a ca. 4,6 mg/100g (Tripaldi et al 1998). Il livello produttivo, la composizione in macro- e micro-nutrienti del latte dei ruminanti è influenzata da numerosi fattori, tra i quali l'alimentazione, le caratteristiche genetiche, la fase di lattazione, il momento della mungitura e lo stato sanitario dell'animale (Morand-Fehr et al., 2007). Uno dei fattori che ha maggiore impatto su produzione e composizione del latte è rappresentato dallo stato sanitario della mammella. Le infezioni mammarie determinano infiammazioni della mammella che, nelle forme cliniche, rendono inutilizzabile il secreto in base alla legislazione sull'igiene degli alimenti. Negli allevamenti sono tuttavia presenti anche forme subcliniche in misura variabile, evidenziabili in base all'incremento del numero delle cellule somatiche, cui sono associate alterazioni qualitative e quantitative del latte prodotto (Paape et al., 2007; Barrón-Bravo et al., 2013).

Va ricordato che l'interesse dei consumatori nel rapporto tra alimentazione e salute ha incrementato la richiesta di informazioni sulle caratteristiche sanitarie specifiche degli alimenti. È noto che il cibo può contenere ingredienti che possono avere benefici fisiologici e/o ridurre il rischio di malattie croniche, ma anche essere significativi fattori di rischio che influenzano la salute. Nel formaggio, durante la proteolisi, vengono liberati

composti come gli amminoacidi che fungono da substrati per batteri con attività decarbossilasica, che mediante reazioni cataboliche secondarie, possono produrre composti bioattivi; alcuni di essi presentano utili proprietà nutraceutiche, come l'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA), mentre altri, come le ammine biogene, possono avere effetti negativi sulla salute umana. Negli ultimi dieci anni l'attenzione è stata rivolta alla presenza di  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) in formaggi e prodotti lattiero-caseari (Mills et al., 2009), in merito ai suoi benefici alla salute, e infatti sono stati prodotti molti alimenti arricchiti di GABA, tra cui formaggi e latticini, (Wang et al., 2010, Nejati et al., 2013). Il GABA è prodotto dalla decarbossilazione del glutammato catalizzata dall'enzima L-glutammico decarbossilasi (GAD). Questo enzima è presente in diverse specie di microrganismi che possono essere utilizzati per lo sviluppo di formaggi probiotici (Wang et al., 2010). E' stato dimostrato che i batteri lattici sono i più interessati alla produzione di GABA,, in particolare diversi ceppi di *Lactobacillus brevis* (Mills, Stanton & Ross, 2009), *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* (Siragusa et al., 2007), *Lactobacillus paracasei* (Komatsuzaki et al., 2008), e *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (Mills, Stanton & Ross 2009, Wang et al 2010, Siragusa et al., 2007). La spp *Enterococcus* e *Streptococcus* specie spp includono anche i ceppi che hanno mostrato attività GAD (Hayakawa et al., 1997). Altre ricerche hanno dimostrato che queste specie di batteri sono coinvolte anche nella produzione di ammine biogene (Galgano et al., 2001; Linares et al., 2012; Lorencová et al. 2012), che ad elevate concentrazioni, possono compromettere seriamente la sicurezza dell'alimento da un punto di vista tossicologico causando effetti negativi sulla salute (Joosten 1988, Stratton,

Hutkins & Taylor, 1991), particolarmente in individui che fanno uso di farmaci, quali ad esempio gli antidepressivi, che inibiscono le monoamminossidasi (MAO), enzimi impiegati dal nostro organismo nella degradazione delle ammine in eccesso. Tiramina,  $\beta$ -feniletilamina, istamina, triptamina, cadaverina, putrescina, spermina e spermidina sono considerate le ammine più importanti presenti nei formaggi in quanto sono coinvolte in diverse reazioni biologiche (Joosten, 1988). Le ammine biogene più comuni si formano dall'amminoacido precursore corrispondente per decarbossilazione e amminazione o transaminazione di aldeidi e chetoni. Nei formaggio le ammine biogene sono considerati un indicatore di cattive condizioni igieniche delle materie prime e/o tecniche di fabbricazione poiché la loro produzione e l'accumulo è spesso associato con l'attività dei batteri contaminanti (Loizzo et al., 2013). In generale, i formaggi di pecora artigianale sono ricchi di GABA (Siragusa et al., 2007), ma anche di ammine biogene (Loizzo et al., 2013, Mascaro et al., 2010). Infatti, l'attività microbica decarbossilasi richiede la disponibilità di amminoacidi liberi precursori, prodotti come risultato della proteolisi, e condizioni favorevoli di pH e temperatura che possono essere realizzate durante la maturazione (Siragusa et al., 2007, Linares et al., 2012, Dhakal , Bajpai e Baek, 2012). Alcune ricerche hanno riferito che il GABA è presente anche nel Pecorino Sardo (Siragusa et al., 2007), così come lo sono le ammine biogene (Manca et al., 2000), anche se questi studi sono stati limitati a pochissimi esempi.

## **SCOPO DELLA TESI**

La ricerca è stata articolata in due fasi:

la prima fase è stata rivolta in particolare allo studio della variabilità nel latte di capra del contenuto di Taurina, composto con importanti funzioni fisiologiche sull'organismo umano. Considerando che uno dei fattori che ha maggiore impatto su produzione quantitativa e qualitativa del latte è rappresentato dallo stato sanitario della mammella si è voluto valutare la variabilità del contenuto in taurina in relazione al contenuto in cellule somatiche. Le infezioni mammarie determinano infiammazioni della mammella che, nelle forme cliniche, rendono inutilizzabile il secreto in base alla legislazione sull'igiene degli alimenti. Negli allevamenti sono tuttavia presenti anche forme subcliniche in misura variabile, evidenziabili in base all'incremento del numero delle cellule somatiche, cui sono associate alterazioni qualitative e quantitative del latte.

Poiché oltre allo stato sanitario dell'animale anche altri fattori quali la razza, il tipo di alimentazione, la fase di lattazione, possono influenzare la qualità del latte e quindi il contenuto di taurina, lo studio ha riguardato:

- due tra le più diffuse razze in Sardegna, la Sarda e la Maltese
- due diversi allevamenti presenti nell'isola con differente dieta alimentare
- 3 fasi di lattazione (febbraio, maggio e giugno)
- diverso stato sanitario degli animali.

Nella seconda fase, la ricerca ha riguardato lo studio della variabilità del contenuto di GABA, amminoacidi liberi e ammine biogene in differenti tipologie di formaggi ovini prodotti in Sardegna, infatti, la letteratura mette in evidenza che questi prodotti artigianali sono ricchi di GABA, ma anche di ammine biogene, nonostante questi studi siano limitati a pochi campioni.

Al fine di valutare la variabilità di questi composti in funzione delle diverse tecnologie di produzione, e valutare se le diverse tecnologie hanno effetti nel favorire la produzione di GABA, composto ad attività benefica sulla salute umana, e/o di ammine biogene che al contrario risultano essere un problema per la sicurezza degli alimenti, la ricerca ha riguardato tre diverse tipologie di formaggi, il Pecorino sardo Dop, il Pecorino del pastore e il Casu marzu.

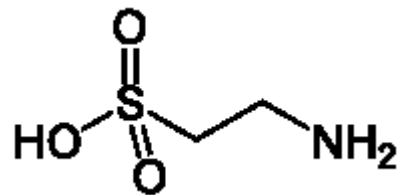
Il Pecorino Sardo è un formaggio prodotto con latte termizzato inoculato con una coltura starter la cui stagionatura avviene in locali con temperatura (tra i 6 - 12 °C) e umidità relativa (tra l'80 - 95%) tenute sotto controllo. Il Pecorino del pastore: è prodotto principalmente in mini-caseifici ubicati presso le stesse aziende zootecniche prodotto con latte crudo, senza aggiunta di colture starter la cui stagionatura avviene in locali con umidità e temperatura non controllati. La ricerca ha riguardato anche il Casu Marzu prodotto con l'uso di larve della mosca casearia *Piophilidae casei*. In questo tipo di formaggio la proteolisi è accelerata a causa dei processi di decadimento causati sia dalle larve dell'insetto che dalle condizioni di maturazione, per questo motivo è importante valutare se le condizioni che si realizzano nel processo di produzione di questo formaggio favoriscono i processi catabolici che portano alla produzione di GABA ed ammine biogene.

## **LA TAURINA**



## Sintesi della Taurina

L'acido 2-amminoetanosolfonico o taurina (dal latino *taurus*, toro, dato che è stata scoperta nella bile del toro dagli scienziati austriaci Friedrich Tiedemann e Leopold Gmelin) (*F. Tiedemann, L. Gmelin 1827*), è un amminoacido che si differenzia dai venti alfa amminoacidi che formano le proteine per la presenza di acido solfonico (SO<sub>3</sub>H) al posto del tradizionale gruppo carbossilico (COOH).

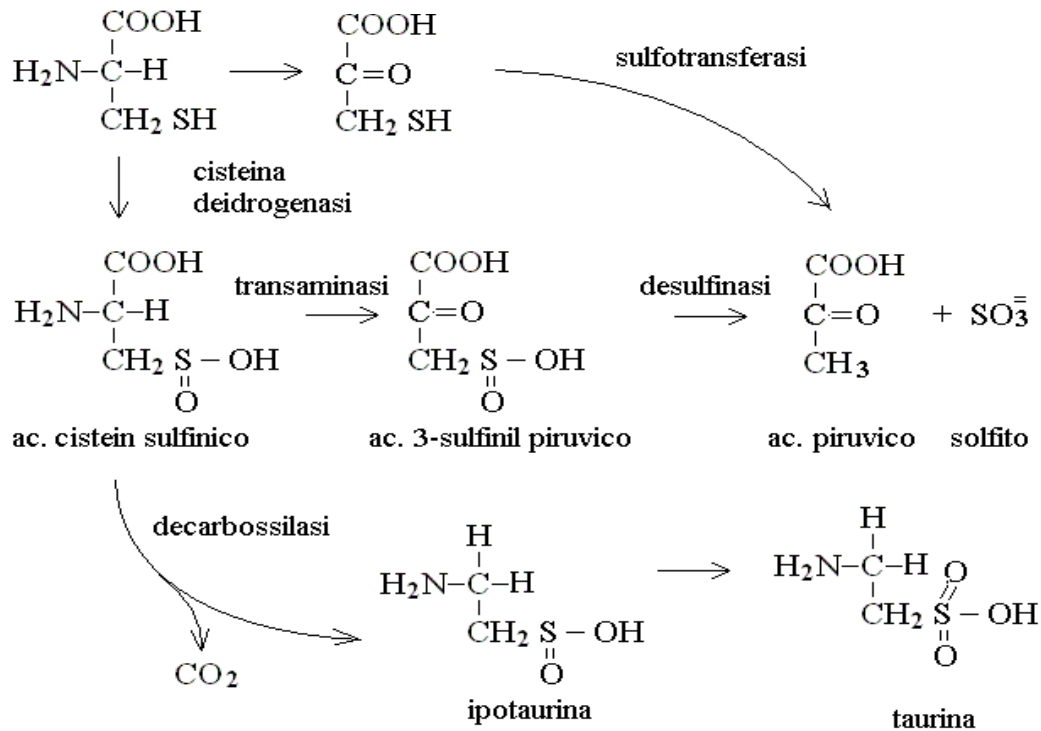


La via metabolica primaria per la sintesi di taurina nei mammiferi avviene nel fegato attraverso il coinvolgimento di un derivato ossidato della cisteina e cioè dell'acido cisteinsolfonico (CSA), importante neurotrasmettitore ad azione eccitatoria ed ossidante. In questa via, il gruppo sulfidrilico della cisteina è all'inizio ossidato a cisteina-acido solfinico dall'enzima cisteina diossigenasi. L'intervento dell'enzima cisteinsolfonico decarbossilasi (CSA-D), insieme alla vitamina B6 (coenzima piridossalfosfato), determina l'eliminazione del gruppo carbossilico e la formazione di "ipotaurina", che successivamente sarà convertita in "taurina" dall'enzima ipotaurina deidrogenasi (Fig. 1).

Questo processo biochimico di decarbossilazione è di fondamentale importanza per passare da uno stato neurochimico di eccitazione e di ossidazione con formazione di radicali liberi ad uno stato di "inibizione e di

antiossidazione”; le proprietà biologiche della taurina sono dovute a questa serie di trasformazioni biochimiche.

**Fig. 1: . Biosintesi della Taurina**



Nel nostro organismo la taurina si trova localizzata nel tessuto nervoso, nei globuli bianchi, nei muscoli scheletrici e nel cuore. Nonostante venga sintetizzata all'interno dell'organismo, in particolari circostanze però può non essere sintetizzata a velocità sufficiente per far fronte alle richieste metaboliche dell'organismo. Per coprirne il fabbisogno giornaliero pertanto è necessario integrare la dose endogena con la taurina presente negli alimenti. La taurina è presente in uova, pesci, carne e latte, ma non negli alimenti di origine vegetale. L'integrazione di taurina potrebbe pertanto

essere utile nei vegetariani, anche se i due amminoacidi precursori (cisteina e metionina) si trovano in discrete quantità anche nei legumi. I neonati non riescono invece a sintetizzare autonomamente la taurina che ricavano dal latte materno che ne è particolarmente ricco.

## **Effetti fisiologici della Taurina**

Poiché si tratta di uno dei pochi amminoacidi non utilizzati nella sintesi proteica, la taurina è spesso definita come un amminoacido “non essenziale”, o più generosamente come un amminoacido “condizionatamente essenziale” per l’uomo e per i primati, ma questi sono chiaramente termini impropri considerando le attività svolte da questo composto nei mammiferi (Sturman 1993).

Il principale ruolo fisiologico della taurina è quello di intervenire nella formazione della bile. Recentemente alcune ricerche sono rivolte infatti, alla sua funzione nella prevenzione dell’aterosclerosi: è in grado di abbassare il livello di colesterolo nel sangue in soggetti in sovrappeso, grazie appunto, alla sua capacità di formare coniugati con gli acidi biliari che estraggono il colesterolo dal plasma (Zhang et al., 2003; Hadi et al 2007; Chen et al. 2012).

In alcuni studi è stato dimostrato che la taurina è efficace nel rimuovere i depositi di grasso sul fegato, nel prevenire malattie epatiche e nel combattere la cirrosi ( M. D. J. Kerai, 1998).

Agisce anche a livello dell’ipertensione in quanto inibisce la produzione dell’angiotensina abbassando quindi la pressione sanguigna. Inoltre regola e migliora la contrattilità del cuore, in quanto, essendo un importante osmolita organico, può regolare il volume cellulare (Pasantes-Morales et al. 1990) e la concentrazione del  $Ca^{2+}$  intracellulare (Wright et al 1995): esercita una funzione membrana-stabilizzante (Pasantes-Morales et al. 1984) rappresentando un meccanismo di difesa per la cellula in presenza di danni provocati da un sovraccarico intracellulare di calcio.

Vi è sempre crescente evidenza che una diminuzione dei livelli di taurina

porti ad una vasta gamma di condizioni patologiche serie, tra cui grave cardiomiopatia (Zulli 2011) e disfunzione renale (Yamori et al. 2010).

Un deficit di Taurina congenito nella via metabolica comporta una particolare sintomatologia nervosa (depressione, confusione mentale, segni di parkinsonismo) confermando le sue proprietà di neurotrasmettitore inibitorio nel SNC (Saransaari e Oja 2008).

La ricerca scientifica ha infatti dimostrato che l'assunzione di integratori di taurina può far scomparire in breve tempo i sintomi legati allo stato depressivo.

Il suo effetto calmante viene sfruttato per la terapia dell'epilessia e si esplica anche al livello della cura dei disturbi legati al sonno.

Esplica la sua azione di neurotrasmettitore anche al livello della retina: un deficit di taurina comporta perdita dei fotorecettori retinici (Schmidt et al 1976). Di particolari interesse sono i disturbi della pigmentazione (depigmentazione della retina e della "substantia nigra cerebrale").

Tale amminoacido risulta avere anche importanti effetti antiossidanti in quanto riduce lo stress ossidativo aumentando l'attività degli enzimi antiossidanti. Tale azione si esplica sia attraverso l'inibizione della produzione di ossido nitroso, che crea danni cellulari, sia attraverso la reazione della taurina contro i ROS, le specie reattive dell'ossigeno o radicali liberi con cui l'amminoacido si combina evitando che vadano a danneggiare le cellule (Schuller-Levis e Park 2003).

Questa attività si applica in particolare a livello di cheratinociti e i melanociti, responsabili della formazione di cheratina e melanina. Per questo motivo la taurina ha un importante ruolo fisiologico anche nella prevenzione dell'invecchiamento cutaneo

Altri studi inerenti hanno evidenziato che l'aumento dei livelli di stress ossidativo fortemente associato al diabete mellito (Goycheva et al 2006), è accoppiato ad un calo del sistema antiossidante non enzimatico che comprende appunto anche la taurina (Johansen et al., 2005).

La taurina è importante per il diabete sia nel prevenire il malfunzionamento delle cellule  $\beta$  pancreatiche (L'Amoreaux et al 2010)

e anche perché svolge un ruolo significativo nel superare l'insulino-resistenza e altri fattori di rischio (quali retinopatie, nefropatie, alterazioni cardiovascolari) causati dal diabete di tipo 1 e tipo 2. La taurina migliora il trasporto di glucosio con azione simile a quella dell'insulina: mobilita e attiva i recettori del glucosio. Come conseguenza diminuisce il livello di glucosio nel sangue e aumenta la sensibilità dei recettori insulinici all'insulina, migliorando l'attività di questo ormone (Nandini e Anuradha 2002; Haber et al 2003; Franconi et al 2004; Franconi et al 2006; De la Puerta et al 2010; Das et al 2012; Ito et al 2012).

Questo composto svolge anche la funzione di modulatore della crescita (Rigo e Senterre 1977), in quanto aumenta il GSH intracellulare. Per questo motivo è aggiunta a tutti i sostituti del latte materno ed agli alimenti per lattanti.

Considerando gli effetti della taurina sull'attività sportiva e sul dimagrimento, molti integratori utilizzati dagli sportivi vengono arricchiti con questo amminoacido. Essa agisce in modo importante sulla contrattilità muscolare e grazie ai benefici che ha anche sul sistema cardiocircolatorio (stimola l'efficienza e la contrattilità cardiaca aumentando l'apporto di sangue al miocardio), è in grado di migliorare le prestazioni atletiche.

## **IL GABA**

## Sintesi del GABA

Il GABA (acido  $\gamma$ -amminobutirrico) è un aminoacido non proteico che si forma dalla decarbossilazione dell'acido glutammico, in una reazione catalizzata dall'acido glutammico decarbossilasi (GAD), enzima altamente specifico che ha come cofattore il piridossal-fosfato (PLP o Vit B6) (Figura 2)

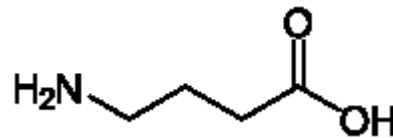
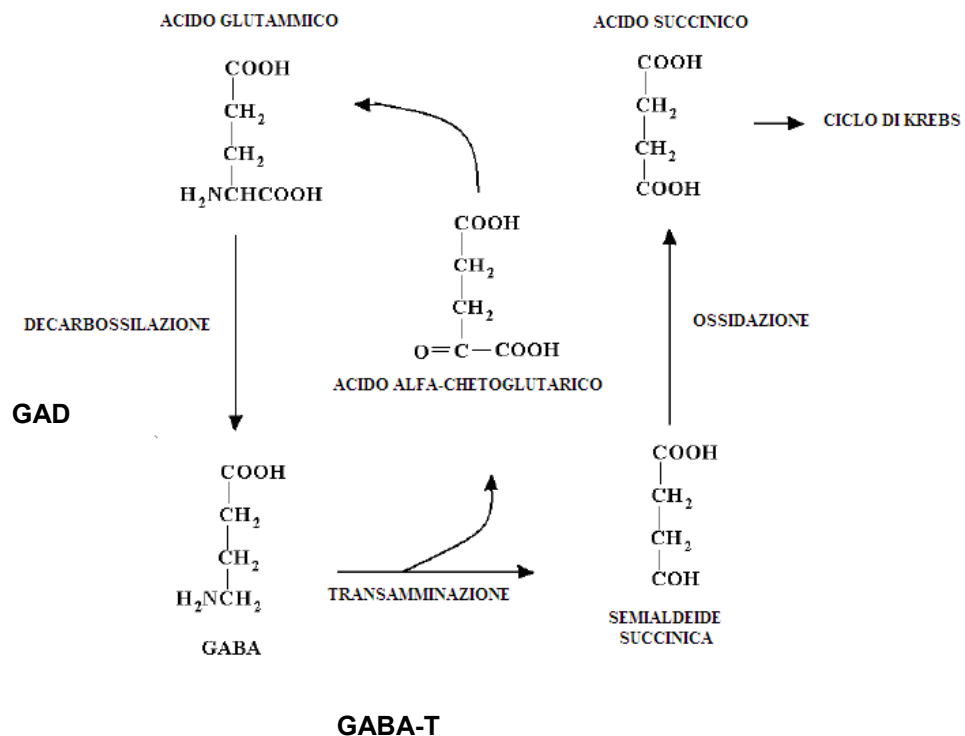


Fig. 2 . Sintesi e degradazione del GABA.





Il GABA, terminata la sua funzione, viene degradato dall'enzima GABA- $\alpha$ -chetoglutarico-transaminasi (GABA-T) che lo deamina a semialdeide succinica; questa viene ossidata ad acido succinico ad opera di una semialdeidesuccinico-deidrogenasi NAD-dipendente ed entra a far parte del ciclo di Krebs.

Il gruppo amminico viene trasferito dalla GABA-T ad una molecola di  $\alpha$ -chetoglutarato per formare l'acido glutammico che viene riutilizzato per la sintesi di nuovo GABA (Fig. ).

La GAD è l'enzima limitante per la biosintesi del GABA ed è concentrata nei terminali nervosi GABAergici (Mugnaini et al., 1985). Gli anticorpi anti-GAD sono utilizzati quali *marker* delle sinapsi GABAergiche.

## **Effetti fisiologici del GABA**

L'acido gamma-aminobutirrico (GABA) fu identificato per la prima volta nel 1950 da E. Roberts e S. Frankel, in estratti cerebrali di differenti specie animali.

Diversi studi hanno confermato che il GABA è il maggior neurotrasmettitore inibitorio del SNC dei mammiferi, dove svolge un importante ruolo nel controllo di varie funzioni cerebrali e quindi nella fisiopatologia di numerose malattie mentali e neurologiche (Oh et al. 2003; Wong et al. 2003).

Studi elettrofisiologici e biochimici hanno dimostrato l'esistenza di tre differenti siti di legame al GABA convenzionalmente denominati GABAA, GABAB e GABAC che differiscono fra loro per struttura molecolare, meccanismo di trasduzione del segnale, distribuzione, funzione e profilo farmacologico.(Barnard et al.,1998)

Sulla base delle loro azioni fisiologiche, si è dimostrato che i recettori GABAA sono coinvolti nel controllo dell'eccitabilità neuronale (Olsen et al.,1997), nella modulazione dell'ansia (Kash et al., 1999), delle sensazioni emotive (feeling), dei ritmi circadiani (Turek and Van Reeth, 1988), della cognizione, vigilanza, memoria, apprendimento (Izquierdo and Medina, 1991) nella farmacologia dell'EtOH e nell'epilessia (Spencer et al., 1994).

La comprensione dei meccanismi molecolari che partecipano all'azione del GABA a livello sinaptico ha permesso di identificare alcuni meccanismi biologici coinvolti nel controllo di questi processi neuronali e di scoprire nuovi agenti terapeutici utili, per esempio, nella terapia dei disturbi d'ansia e della patologia epilettica.

Infatti, molte delle aree cerebrali coinvolte nella modulazione degli stati ansiosi contengono reti di interneuroni GABAergici.

Questo sistema di trasmissione neuronale esercita la sua funzione inibitoria limitando il rilascio di molti mediatori ad azione ansiogenica .

Studi neurochimici effettuati su topi deficienti della GAD, hanno dimostrato come l'interruzione della trasmissione GABAergica possa provocare l'ansia (Stork et al., 2000; Millan et al., 2003).

Studi effettuati da Hertz (1993) dimostrano effetti positivi di questo composto nel trattamento dell'insonnia.

Il GABA viene venduto come integratore alimentare per le sue proprietà di “sedativo” naturale che al contrario dei tranquillanti e degli psicofarmaci tradizionali, non ha alcun potere di assuefazione e nessuno degli effetti collaterali di tali sostanze.

Il GABA ha inoltre proprietà analgesiche. E' stato riscontrato infatti, che negli individui che praticano sport a livello agonistico e che assumono il GABA, i dolori connessi all'allenamento sono di entità minore e parallelamente aumenta il limite di tolleranza del dolore. Questa molecola inoltre, favorisce il rilascio di ormoni importanti per la crescita muscolare come il testosterone e l'ormone della crescita GH (Growth Hormone), uno degli ormoni più importanti dell'organismo, che viene prodotto nell'ipofisi e distribuito in tutto il corpo. Il GABA intensifica così due dei principali fattori che contribuiscono alla crescita muscolare: ormone della crescita e riposo e conseguente effetto a livello della perdita di grasso (Power et al., 2003-2008). Il GH è importante, oltre che per la formazione della muscolatura possiede proprietà anti-invecchiamento e di prevenzione di molte malattie. Con l'invecchiamento

si verifica una riduzione del livello e dell'attività del GABA che potrebbe anche essere la causa di malattie tipiche della vecchiaia che si accompagnano, ad esempio a disturbi di deambulazione e a crampi. Il GABA oltre ad essere conosciuto per il suo effetto di rilassamento e ansiolitico ha anche un effetto anticonvulsioni ( Foster et al., 2006).

E' addirittura un supporto nel trattamento delle depressioni (Hasler et al., 2007; Oh et al. 2003), del morbo di Parkinson e dell' Alzheimer (Wong et al. 2003).

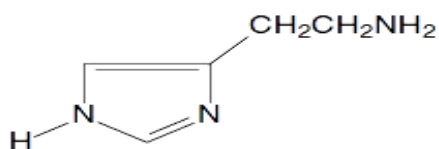
Diversi studi hanno rimarcato i suoi effetti positivi anche nella prevenzione del diabete, in particolare quello di tipo 1, essendo un forte segregatore di insulina dal pancreas (Hagiwara et al. 2004).

E' stato scoperto che le iniezioni di GABA ad esemplari di topi con diabete di tipo 1 non solo hanno impedito il diabete nei topi, ma anche invertito la malattia. Questa molecola agisce nel pancreas rigenerando le cellule  $\beta$  produttrici di insulina andate distrutte e agisce sul sistema immunitario per fermare la distruzione delle stesse. Queste due azioni sono necessarie per invertire la malattia e prevenirne il ripetersi. Fino ad ora, non c'è stato alcun trattamento efficace che raggiunge entrambi gli obiettivi allo stesso tempo (Wong et al. 2003).

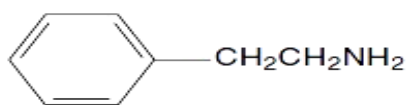
Questo composto presenta anche proprietà antitumorali (Thaker et al. 2005).

## **LE AMMINE BIOGENE**

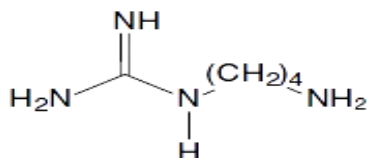
Le ammine sono basi organiche a basso peso molecolare che in base alla loro struttura chimica possono essere classificate in diammine e poliammine alifatiche (putrescina, cadaverina, spermina, spermidina e agmatina), monoammine aromatiche (tiramina e  $\beta$ -fenilettilammina) o ammine eterocicliche (istamina, triptamina).



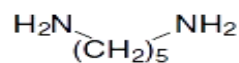
Istamina



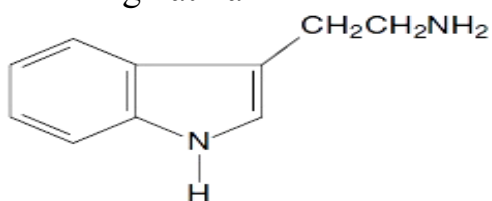
$\beta$ -Fenilettilammina



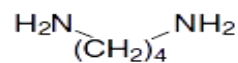
Agmatina



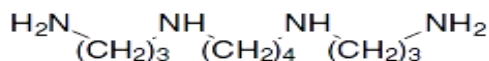
Cadaverina



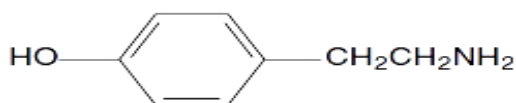
Triptamina



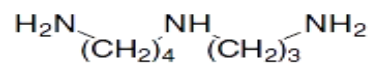
Putrescina



Spermina



Tiramina



Spermidina

## **Biosintesi delle ammine biogene**

Le ammine biogene, in particolare istamina, putrescina, spermidina e spermina, sono sintetizzate da normali processi metabolici di batteri, vegetali (frutta e legumi) e animali.

Pertanto possono trovarsi allo stato naturale nelle derrate grezze che sono consumate tale quali o che servono da materia prima per l'industria agro-alimentare.

Le ammine biogene nell'organismo umano sono coinvolte nelle comunicazioni tra le cellule e in particolare sono presenti in specifici tipi cellulari detti trasportatori di ammine.

La formazione di ammine biogene coinvolge molti tipi di reazioni chimiche:

- decarbossilazione di amminoacidi che sono i principali costituenti delle proteine: decarbossilazione dovuta a degli enzimi (decarbossilasi) esistenti nelle materie prime; decarbossilazione provocata da enzimi microbici prodotti da microrganismi appartenenti alla flora di contaminazione degli alimenti o da microrganismi chiamati a intervenire nei processi di fermentazione;
- Amminazione o transaminazione di aldeidi e chetoni;
- Degradazione (soprattutto per idrolisi) di composti azotati.

La figura 3 schematizza la formazione di ammine biogene che avviene sia direttamente che indirettamente, dalla decarbossilazione di sette amminoacidi (triptofano, lisina, arginina, glutamina, tirosina, istidina, fenilalanina), ad opera di decarbossilasi specifiche per ciascun amminoacido.



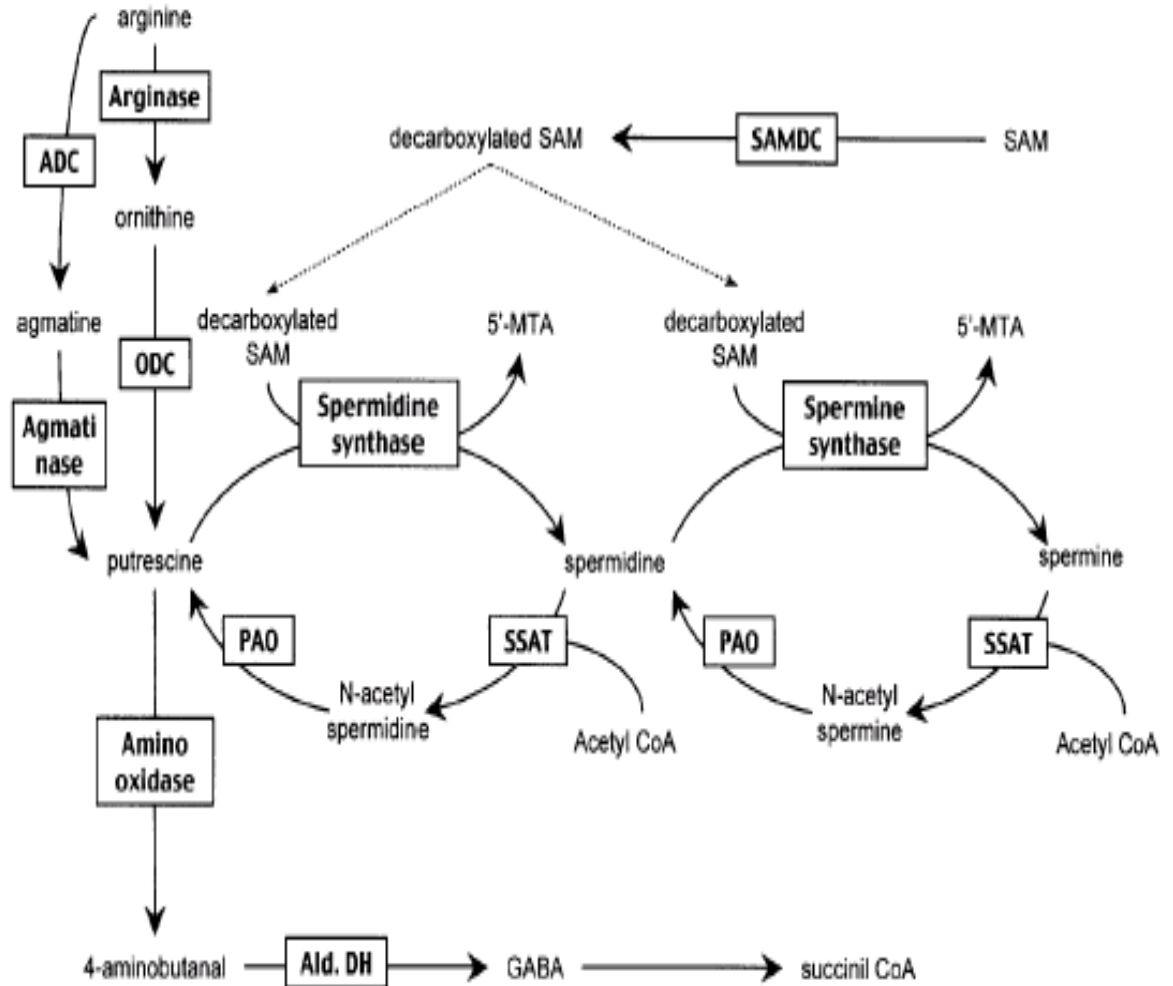


Esse operano secondo due possibili modalità, a seconda che la reazione dipenda o meno dall'assistenza di un catalizzatore: il piridossal-fosfato.

Esistono specifiche decarbossilasi: una aromatica per serotonina, triptamina e dopamina, un'istidino decarbossilasi per istamina, un'arginino decarbossilasi per l'agmatina e un ornitino decarbossilasi per la putrescina. Nel dettaglio (Fig.4) la putrescina, può essere formata per decarbossilazione dell'ornitina, ma può avere come amminoacido precursore anche l'arginina. Alcuni dei più probabili processi degradativi enzimatici a carico di questo amminoacido descritti nella figura 2 mostrano come:

- L'arginina può evolvere ad ornitina che per decarbossilazione si trasforma in putrescina;
- Per decarbossilazione dell'arginina si forma agmatina che per sviluppo di urea o di  $\text{CO}_2$  e  $\text{NH}_3$  origina putrescina (Higarashi et al., 2000).
- A partire dalla metionina si ottiene un suo derivato la S-adenosil-metionina, che per decarbossilazione, perde una parte della molecola il radicale aminopropile e si trasforma in metiltioadenosina;
- Il radicale aminopropile liberato si lega a una molecola di putrescina sotto l'azione della spermidina sintetasi (putrescina aminopropil transferasi) e la trasforma in spermidina;
- Infine la stessa reazione permette di passare dalla spermidina alla spermina, ad opera di una spermidina sintetasi (spermidina aminopropiltransferasi).

**Fig.4. Possibili processi metabolici di poliammine nell'organismo (Medina et al., 2003)**



ADC: arginino decarbossilasi, ODC: ornitina decarbossilasi, PAO: poliammine ossidasi, SAM: S-adenosilmetionina, SAMDC: S-adenosilmetionina, Ald.DH: aldeide deidrogenasi, SSAT: spermidina/spermina N-acetiltransferasi, 5'-MTA: 5-metiltoadenosina

## **Catabolismo delle ammine biogene**

Gli organismi viventi, sono capaci di eliminare le ammine biogene attraverso differenti vie cataboliche:

- Deaminazione ossidativa ad opera di enzimi, monoammino-ossidasi MAO e diammino-ossidasi DAO che esistono nella maggior parte dei tessuti ed in particolare nella sostanza grigia del cervello per le MAO e nell'intestino per le DAO. Questo meccanismo è il più rilevante;
- N- e O- metilazione con una transferasi e adenosilmetionina;
- N-acetilazione con delle N-acetiltransferasi e l'acetil-CoA come cofattore;
- Idrossilazione con una idrossilasi e NAD<sup>+</sup> come cofattore.

Tuttavia l'attività di questi enzimi è dipendente dalle condizioni dell'intestino che ne influenza l'assorbimento e la biodisponibilità.

Normalmente, a livello intestinale, per eliminare le ammine biogene intervengono le difese immunitarie, tale sistema ha capacità limitate poiché in seguito all'assorbimento di ammine biogene va incontro a saturazione e può favorire una loro entrata in circolo con effetti tossici.

I soggetti sottoposti a trattamento con medicinali inibitori delle monoamminoossidasi IMAO sono particolarmente esposti a disturbi gravi, per esempio crisi ipertensive, dovute alla tiramina.

Analoghe conseguenze si verificano nei soggetti con deficienza di diamminoossidasi, enzima che catabolizza l'istamina nell'intestino; questa deficienza può essere di origine genetica o patologica.

Esistono almeno due tipi molecolari di MAO che mostrano affinità diverse per i substrati e differenti sensibilità a inibitori selettivi:

- Le MAO-A deamminano preferibilmente la serotonina, l'adrenalina e la noradrenalina;
- La MAO-B deamminano preferibilmente la  $\beta$ - feniletilammina;
- Tutte e due deamminano l'istamina, la tiramina, la triptamina e la dopamina.

Anche l'etanolo è un inibitore delle MAO di conseguenza il consumo di bevande alcoliche accentua la sensibilità alle ammine biogene.

I farmaci antistaminici e alcune ammine biogene (tiramina, cadaverina, agmatina spermina e spermidina) inibiscono le diammino-ossidasi DAO, che deamminano l'istamina e la putrescina con conseguente aumento della concentrazione di queste ultime due sostanze nel sangue.

## **Effetti fisiologici delle ammine biogene**

Usualmente le ammine biogene non rappresentano un pericolo per la salute degli individui, a meno che non ne vengano ingerite grandi quantità, oppure che il naturale catabolismo delle ammine sia inibito o geneticamente deficiente.

Diversi studi epidemiologici hanno evidenziato la tossicità esercitata dalle ammine in individui sensibili, quando queste vengano assunte in quantità elevate con gli alimenti (Lanza et al., 1996; Taylor et al., 1989).

Il rapporto tra consumo di alimenti contenenti ammine e mal di testa fu individuato inizialmente nei pazienti sottoposti a terapie inibitorie contro la tubercolosi e anti-depressive ai quali venivano somministrati farmaci anti-monoamminaossidasi (anti-MAO). La funzione degli enzimi MAO è di metabolizzare le ammine potenzialmente nocive prima che si diffondano nel sangue. L'uso di farmaci inibitori della monoammine ossidasi limita il meccanismo naturale di detossificazione, portando ad un aumento del livello di ammine nel sangue. Alcuni individui inoltre potrebbero avere una deficienza genetica di enzimi MAO che spiegherebbe l'insorgere dei sintomi.

Le ammine biogene hanno proprietà:

- Psicoattive (effetti sul sistema nervoso centrale);
- Vasoattive (vasocostrizione o vasodilatazione);
- Ipertensive o ipotensive.

Nella tabella 1 vengono riassunti gli effetti farmacologici di 6 ammine biogene (Shalabi et al., 1996).

**Tab. 1 Effetti farmacologici di 6 ammine biogene**

<b>Ammine</b>	<b>Effetti farmacologici</b>
Istamina	Libera adrenalina e noradrenalina Eccita la muscolatura liscia dell'utero, dell'intestino, dell'apparato respiratorio Stimola i neuroni sensoriali e motori Controlla la secrezione acida dello stomaco
Tiramina	Vasocostrizione periferica Aumento della frequenza cardiaca Causa lacrimazione e salivazione Aumento del respiro Aumento della glicemia Liberazione di noradrenalina dal sistema nervoso simpatico Emicrania
Putrescina Cadaverina	Ipotensione Bradycardia Contrazione intensa della mascella Paresi delle estremità Potenziamento della tossicità di altre ammine
$\beta$ -feniletilammina	Liberazione di noradrenalina dal sistema nervoso simpatico Aumento della pressione sanguigna Emicrania
Triptamina	Aumento della pressione sanguigna

### ***Effetti dell'istamina***

L'istamina ha degli effetti fisiologici importanti e gioca un ruolo di mediatore in molti processi biologici (Dacosta 1999):

- Meccanismi dell'infiammazione ;
- Fenomeni anafilattici;
- Manifestazioni allergiche;
- Contrazione della muscolatura liscia (intestino, apparato respiratorio, utero);
- Vasodilatazione delle arteriole, dei capillari e dei vasi sanguigni periferici;
- Abbassamento della pressione sanguigna;
- Aumento della permeabilità dei capillari (edema);
- Aumento del ritmo e della forza di contrazione cardiaca;
- Ipersecrezione del succo gastrico;
- Aumento della secrezione del pancreas e della mucosa intestinale;
- Stimolazione dei neuroni sensoriali e motori per azione sui neurotrasmettitori;
- Liberazione di adrenalina e noradrenalina a partire dalle ghiandole surrenali.

L'istamina è un costituente del corpo umano normalmente presente in tutti i tessuti del corpo.

E' particolarmente elevata nella cute, nei polmoni, nella muscolatura intestinale e nel SNC .

Essa deriva dalla decarbossilazione dell'amminoacido istidina, ad opera della istidina-decarbossilasi, e una volta sintetizzata, viene immagazzinata

nei mastociti e nei basofili del sangue, rimanendo inattiva finché non interviene uno stimolo a liberarla (Bentley et al., 1995).

L'istamina può essere di origine esogena, in seguito all'ingestione di alimenti che la contengono (formaggi, birra, vino, cioccolato, patate, aringhe, tonno), o endogena, dovuta al suo rilascio da cellule del tratto gastrointestinale o per l'intervento dei batteri della flora intestinale. Alcuni alimenti ad alto contenuto di amidi e cellulosa, come i farinacei, i legumi, le patate, intervengono sull'equilibrio della flora intestinale stimolando lo sviluppo di batteri capaci di operare la trasformazione dell'istamina.

Nelle normali condizioni fisiologiche l'istamina libera si trova in piccola quantità nel sangue, con un tenore abituale di 60, 70  $\mu\text{g/l}$  ma può aumentare in seguito ad un apporto esterno eccessivo e/o da una carenza di agenti di eliminazione (MAO, DAO).

Infatti in alcuni soggetti, a causa di una carenza dei meccanismi di detossificazione, l'ingestione di cibi ricchi di istamina può indurre reazioni pseudo allergiche da alimenti.

In soggetti adulti in buona salute, la somministrazione per via intravenosa di istamina in piccole quantità, da 0,25 a 0,5 mg di istamina cloridrato secondo Cabanis (1985), scatena immediatamente dei disturbi violenti: cefalea lancinante, rossori al viso, oppressione, vertigini, vomito, diarrea, sudorazione abbondante.

Alcuni autori (Joosten et al., 1988) indicarono che l'iniezione intravenosa di 8  $\mu\text{g}$  d'istamina induceva una vasodilatazione e un aumento del ritmo cardiaco.



Per via orale la quantità tollerata è molto più grande perché i processi di degradazione dell'istamina nell'intestino dell'uomo si oppongono al passaggio nel circolo sanguigno.

I maggiori sintomi provocati dall'ingestione di alimenti contenenti un tasso elevato d'istamina sono cefalea, ipotensione, accelerazione del battito, rossore della pelle (particolarmente sul viso), gonfiore della lingua, gonfiore del viso e del collo, sudorazione, gonfiore del ventre, dolori di stomaco, nausea, vomito, crampi addominali, diarrea, sete, sensazione di bruciore e pizzicore nella bocca, nelle labbra, e nella gola, difficoltà ad inghiottire, orticaria, prurito, stordimento, debolezza generale (Brown et al., 2001).

In casi gravi, può sopraggiungere uno stato di shock, spasmi bronchiali, soffocamento e un pericolo respiratorio (Di Tullio et al., 2001).

L'azione tossica dell'istamina sembra dovuta principalmente a tre fattori:

- esistenza di potenziatori della tossicità come la putrescina e la spermina che ne favoriscono l'assorbimento;
- inibitori dell'attività enzimatica della diammino-ossidasi (DAO) come la cadaverina, amminoguanidina e tiramina, inibitori della N-metiltransferasi come la tiramina, triptamina, feniletilamina per i quali aumenta l'assorbimento intestinale dell'istamina fino a produrre nel plasma concentrazioni tali da dar luogo alla patologia da avvelenamento istaminico;
- eventuali lesioni della mucosa intestinale (Brown et al., 2001).

L'azione nociva per l'uomo in seguito all'ingestione di istamina è conseguente al consumo di diverse categorie di alimenti, fra tutti quello più incriminato è il pesce (avvelenamento da sgombroidi) (Taylor et al., 1991).

È difficile determinare una soglia di tossicità per l'ingestione di istamina, in quanto gli effetti variano da soggetto a soggetto e sono rafforzati dalla presenza di inibitori degli enzimi detossificanti.

La dose tossica per via orale può variare da 70 a 1000mg.

Tuttavia, negli Stati Uniti la FDA ha fissato a 50mg /100g il limite accettabile di istamina nel tonno, e dichiara difettoso il tonno che contiene più di 20mg/100g (10mg/100g se presenta dei segni di decomposizione) (Food and Drug Administration, 1995).

In Europa la Direttiva 91/493/CEE pubblicata nel giornale ufficiale della Comunità Europea in data 24/9/1991, stipula che un lotto di pesce deve essere rifiutato se si trovano in nove campioni rappresentativi:

- Un tenore medio di istamina superiore a 10mg/100g;
- Più di due campioni contenenti fra 10 e 20 mg/100g;
- Un campione contenente più di 20mg/100g.

La direttiva aggiunge che per i pesci appartenenti alla famiglia degli sgombroidi sottoposti a trattamenti di maturazione e di salatura, il limite è il doppio di quello dei pesci freschi.

Questo limite può sembrare basso in rapporto alla quantità ingerita senza inconvenienti da molti volontari sottoposti a sperimentazione, ma dosi da 10 a 20mg/100g indicano un inizio di contaminazione microbica nei pesci freschi che rischia di aumentare nel corso dello stoccaggio, portando ad un tenore di istamina molto più elevato.

Nelle bevande alcoliche, vino e birra, non ci sono dei massimi legali, ma alcuni paesi, in modo del tutto arbitrario, hanno posto dei limiti massimi raccomandati per l'istamina nei vini: da 2 mg/l la Germania a 10 mg/l Svizzera e Austria.

Sarebbe meglio stabilire un limite legale per l'insieme di ammine biogene, perché queste inibiscono gli enzimi detossificanti e dunque aumentano la quantità di istamina assorbita dall'intestino.

Silla Santos (1996) ha considerato che un tasso globale di 100mg di ammine in 100g di alimenti è pericoloso per la salute.

### ***Effetti della tiramina***

La tiramina è prodotta dalla decarbossilazione della tirosina.

È presente nell'organismo umano ad una concentrazione normalmente molto più piccola dell'istamina.

La tiramina esercita i seguenti effetti fisiologici: (Dacosta, 1999)

- Vasocostrizione periferica;
- Aumento del debito cardiaco, palpitazioni;
- Aumento della tensione arteriosa;
- Lacrimazione e salivazione;
- Dilatazione delle pupille;
- Accelerazione della respirazione;
- Aumento della sudorazione;
- Aumento della glicemia;
- Liberazione della noradrenalina a partire dal sistema nervoso simpatico;
- Emicrania;
- Febbre;
- Vomito (qualche volta);

L'effetto più importante sembra essere la liberazione di noradrenalina, perché questa catecolamina, precursore dell'adrenalina, ha molte

funzioni; in particolare ha un azione vasocostrittrice e ipertensiva, e aumenta il ritmo cardiaco.

L'emicrania sembra essere il sintomo più rilevante in una intossicazione da tiramina. L'ingestione di 125 mg sono sufficienti a scatenare un attacco di emicrania nei soggetti sensibili.

È stato constatato su dei volontari che il consumo di tiramina non produce alcun effetto. Questo è dovuto all'efficacia dei meccanismi di detossificazione esistenti nel tratto digerente.

Le persone trattate con farmaci che inibiscono le MAO sono molto sensibili all'ingestione di tiramina, che causa un'intossicazione pericolosa con crisi d'ipertensione e violenti mal di testa, che può portare ad un'emorragia intracranica, disordini nervosi, edema polmonare e qualche volta ad arresto cardiaco.

È stato stimato che per pazienti che assumono IMAO l'ingestione di tiramina può avere delle ripercussioni gravi dovute soprattutto all'eccessivo aumento della pressione arteriosa;

Brink et al. (1990) hanno valutato la concentrazione tossica di tiramina negli alimenti tra 10 e 80mg/100g.

### ***Effetti della $\beta$ -feniletilammina***

La  $\beta$ -feniletilammina è prodotta dalla decarbossilazione della fenilalanina.

La sua formula chimica è molto simile a quella della tiramina e quindi anche la sua azione è simile (Dacosta, 1999).

In particolare:

- libera la noradrenalina a partire dal sistema nervoso simpatico;
- aumenta la pressione arteriosa;
- determina una vasocostrizione periferica;
- causa emicrania.

La sua decarbossilazione nel tratto digerente avviene principalmente per ossidazione catalizzata dalla monoamminoossidasi B. E' controindicata in soggetti che assumono IMAO, anche se i casi di intossicazione osservati sono meno numerosi di quelli osservati con la tiramina, questo è dovuto perchè la presenza di  $\beta$ -feniletilammina negli alimenti è meno frequente.

Qualche autore afferma che negli alimenti la concentrazione tossica per soggetti normali è di 3mg/100g.

### ***Effetti della triptamina***

La triptamina è prodotta per decarbossilazione del triptofano.

Ci sono pochi elementi sugli effetti della sua ingestione per via orale.

Sembra che aumenti la pressione arteriosa.

### ***Effetti delle poliammine: putrescina, spermidina e spermina***

Le poliammine sono costituenti universali delle cellule viventi, si trovano nei microrganismi, nelle piante, negli animali

Le poliammine svolgono nell'organismo delle funzioni indispensabili e importanti. Le loro molecole, essendo costituite da lunghe catene policationiche (soprattutto la spermina che è una tetra-ammina) e flessibili, hanno una forte affinità per i radicali acidi, per esempio quelli dell'acido desossiribonucleico DNA e ribonucleico RNA.

Esse permettono di stabilire dei ponti tra cariche negative distanti le une dalle altre. Le poliammine stimolano la biosintesi delle proteine e si pensa contribuiscano alla stabilizzazione delle membrane (Kalac et al. 2005).

Esse sono necessarie affinché le cellule abbiano una crescita ottimale. Sono implicate nella crescita e sviluppo delle ossa.

Diversi studi (Minois et al., 2011) hanno dimostrato il loro ruolo nell'invecchiamento in particolar modo la Spermidina può essere utile in organismi sani (possono essere dannose in individui malati). Si trovano infatti specialmente nei tessuti in rapida crescita, questo effetto è benefico quando si tratta di una rigenerazione cellulare, è dannoso quando riguarda cellule tumorali, dove la loro concentrazione è elevata.

Si pensa che la loro inibizione possa avere un effetto antitumorale.

Alcuni studi hanno evidenziato che le poliammine esercitano attività antinfiammatorie nelle infiammazioni acute e croniche (Lagishetty et al., 2008).

Putrescina, spermidina e spermina sono risultati essere essenziali per il sistema riproduttivo maschile e femminile e per lo sviluppo embrio/fetale,

anche se non sono ancora chiari quali siano i meccanismi attraverso i quali regolano questi molteplici e diversi processi (Lefèvre et al., 2011).

La spermina inoltre gioca un ruolo importante anche nella prevenzione delle allergie nei bambini, soprattutto nei meccanismi di regolazione cibo-allergene e assorbimento da parte dell'intestino.

Il rinnovamento delle cellule epiteliali dell'intestino è più rapido di quello di altri tessuti, l'integrità e il buon funzionamento di questi organi esigono la presenza di una quantità sufficiente di poliammine.

Sebbene l'organismo umano sia in grado di sintetizzare ex novo le poliammine è nota una continua richiesta supplementare dagli alimenti, d'altra parte l'assorbimento delle ammine con la dieta è essenziale per garantire il ripristino dell'epitelio intestinale.

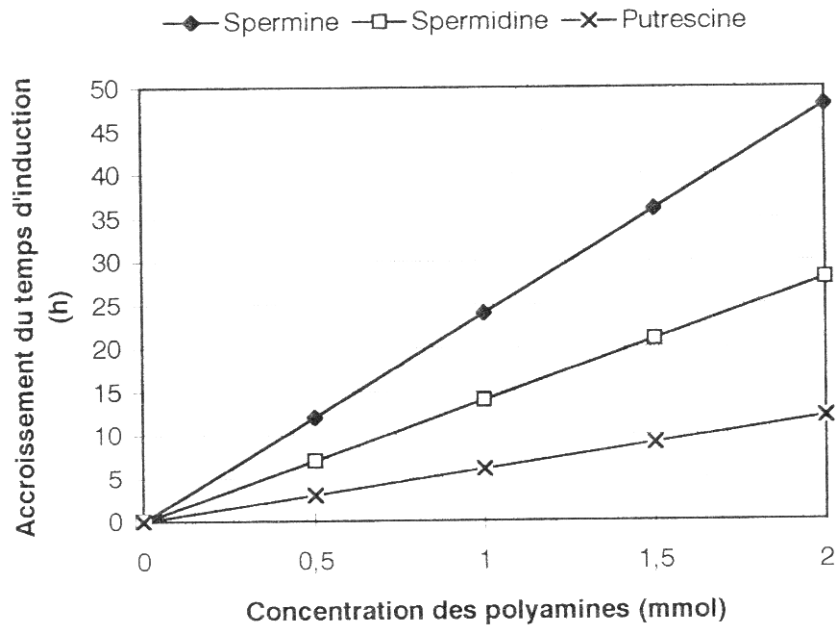
Oltre a partecipare a numerosi processi fisiologici favorevoli, le poliammine sono anche coinvolte in molti processi dannosi per la salute umana (Kalac 2014). Elevati livelli di poliammine alimentari infatti possono compromettere la salute dell'uomo: questo è dovuto al fatto che alcuni sottoprodotti del loro catabolismo contribuiscono all'eziologia di molti stati patologici. Diversi studi hanno dimostrato il loro coinvolgimento nelle malattie neurodegenerative, epilessia, schizofrenia, ansia; ischemia, ictus; fibrosi cistica e insufficienza renale (Seiler et al.,1990). Come già accennato, le poliammine non determinano il cancro ma accelerano la crescita delle cellule tumorali. Un aumento del livello di poliammine nella dieta porta ad un abbassamento delle difese immunitarie e di conseguenza anche ad una meno efficace funzione antitumorale dell'organismo (Soda et al., 2011). Studi effettuati su pazienti affetti da carcinoma alla prostata ad esempio, hanno evidenziato come riducendo l'assunzione di poliammine

nella dieta si ha un valido aiuto nella terapia antitumorale (Cipolla et al., 2007). Altri studi confermano il loro ruolo anche nella degenerazione del pigmento della retina (Kaneko et al., 2007) e nella formazione delle nitrosammine cancerogene. Una decina di pubblicazioni, scaglionate tra il 1939 e 1988, avevano suggerito che le poliammine possono svolgere il ruolo di antiossidanti cellulari. Questa possibile attività sembra essere collegata alla loro partecipazione nella riduzione dei danni alle membrane cellulari e al DNA. Sono in grado di eliminare gli agenti dell'ossidazione che sono l'anione superossido e il radicale idrossido. In particolare la Spermidina e la spermina possono agire come pro-ossidanti e migliorare il danno ossidativo ai componenti del DNA in presenza di ioni ferro liberi e perossido d'Idrogeno (Mozdzan et al., 2006). In un ulteriore documento (Lovaas et al., 1991) viene messa a confronto l'efficacia delle poliammine e di altri antiossidanti contro l'ossidazione di olio di pesce e di acidi grassi polinsaturi con l'idea di trovare un antiossidante di origine naturale che possa sostituire l' $\alpha$ -tocoferolo.

La figura 5 confronta l'aumento dei tempi di induzione provocati dall'addizione di tre poliammine, a dosi diverse. Da questo si vede che il potere antiossidante è maggiore nelle spermina rispetto alla spermidina e alla putrescina. La differenza del potere antiossidante delle tre poliammine (spermina, spermidina e putrescina) può essere dovuto al fatto che la prima è una tetra-ammina, la seconda una triammina e la terza una diammina, e che è il radicale ammino che ostacola l'ossidazione.



Fig. 5. Azione antiossidante di tre poliammine



### *Effetti della cadaverina*

È prodotta dalla decarbossilazione della lisina.

La sua formula chimica è simile a quella della putrescina, differisce solamente per l'aggiunta di un gruppo  $-CH_2-$ .

Viene degradata dalle diammine-ossidasi (DAO).

I suoi effetti tossici sono gli stessi della putrescina.

## **Presenza di ammine biogene negli alimenti**

Le ammine biogene sono presenti in una vasta varietà di alimenti come pesce, carne, vegetali, frutta, nocciole, cioccolato ed altri prodotti ad elevato contenuto proteico come formaggio vino, birra, la cui tecnologia di preparazione prevede processi di tipo fermentativo. Le ammine, possono essere presenti sia in alimenti igienicamente salubri, sia in alimenti deteriorati. In quest'ultimo caso la presenza di ammine biogene può servire come utile indicatore analitico di un alimento contaminato.

I presupposti per la formazione delle ammine biogene negli alimenti sono legati alla presenza di amminoacidi liberi precursori, presenti come tali negli alimenti o liberati da proteine nell'attività proteolitica, di microrganismi decarbossilasi positivi e di condizioni ambientali favorevoli alla loro crescita quali qualità e igiene delle materie prime, pH, temperature, salinità e diverse tecniche di produzione.

I microrganismi decarbossilasi positivi costituiscono parte della popolazione associata dell'alimento oppure possono essere introdotti per contaminazione prima, durante o dopo i processi di lavorazione.

Nel caso di alimenti fermentati e non (formaggi, insaccati ecc.) e bevande, (vino, birra ecc.), la produzione di ammine biogene può essere influenzata anche dall'introduzione di starter microbici utilizzati nei processi tecnologici di lavorazione.

Nelle tabelle 2,3,4,5 viene indicato il tenore medio di poliammine in una serie di alimenti determinate con HPLC (Kalac et al., 2005).

Dalle tabella si vede che la quantità massima di putrescina si trova in formaggi stagionati (cheddar, formaggi spagnoli), arance, mandarini, pomodori, spinaci, salsa di soia, chorizo, crauti, merluzzo, salsa di pesce; la

quantità massima di spermidina come per la putrescina si trova nel cheddar stagionato e fresco, nel blue spanish, nel vitello crudo, nel vitello macinato, nei broccoli, nelle fave di soia, nei fagioli, nei piselli cotti e nelle pere. Per quanto riguarda la spermina le quantità maggiori si trovano nei piselli cotti, nel maiale, nel prosciutto affumicato, nelle pere, nel the nero e nel cheddar stagionato.

**Tab. 2 Contenuto di poliammine (mg/Kg) in cereali e legumi**

Product	n	Putrescine				Spermidine				Spermine				References
		x	S <sub>x</sub>	x <sub>min</sub>	x <sub>max</sub>	x	S <sub>x</sub>	x <sub>min</sub>	x <sub>max</sub>	x	S <sub>x</sub>	x <sub>min</sub>	x <sub>max</sub>	
<i>Cereals</i>														
Wheat flour	2	1.5				9.6				5.3				Okamoto et al. (1997)
Bread, white	3			1.5	1.8			5.0	5.2			3.4	3.8	Bardócz et al. (1993)
Whole grain	3			0.5	0.9			21.3	27.4			7.1	9.1	Bardócz et al. (1993)
	5	3.4	0.5	2.5	4.0	13.1	1.5	10.2	14.8	6.3	2.0	3.4	8.7	Eliassen et al. (2002)
Pasta, cooked	3			1.0	1.1			7.0	7.3			10.5	12.9	Bardócz et al. (1993)
Breakfast cereals, mixed	10			2.0	2.2			24.1	24.4			6.1	6.7	Bardócz et al. (1995)
Rice, polished	2	<0.9				3.9				<4.1				Okamoto et al. (1997)
Cooked	3			1.0	1.3			1.3	1.6			8.1	10.1	Bardócz et al. (1993)
<i>Legumes</i>														
Green peas, frozen	14	46.3	27.0	11.7	107	46.6	23.5	2.9	88.4	3.8	2.0	ND	8.5	Kalač et al. (2002)
Cooked	3			5.4	5.9			62.1	68.2			33.5	71.7	Bardócz et al. (1993)
Green beans, cooked	3			4.3	5.4			7.7	8.8			4.6	5.5	Bardócz et al. (1993)
Red kidney bean	3			0.3	0.4			19.0	20.0			22.8	25.7	Bardócz et al. (1993)
Soybean, dried	3			1.6	6.5			33.2	62.1			29.7	34.3	Bardócz et al. (1993)
	1	17.0				128								Ziegler et al. (1994)
	2	41				207				69				Okamoto et al. (1997)
Soybean miso	11	51.1	40.7	9.8	143.1									Yen (1986)
	2	20.2				11.7				2.0				Okamoto et al. (1997)
Soy sauce	22	88.1	129	ND	514									Yen (1986)
Koikuchi	2	47.5				14.5				<1.0				Okamoto et al. (1997)
Different	23			ND	205									Stute, Petridis, Steinhart, and Biernoth (2002)

**Tab. 3. Contenuto di poliammine (mg/Kg) in patate, verdura e frutta**

Product	n	Putrescine				Spermidine				Spermine				References
		$\bar{x}$	$S_x$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	$\bar{x}$	$S_x$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	$\bar{x}$	$S_x$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	
Potato, fresh	3	9.7				11.2				3.0				Bardócz et al. (1993) Okamoto et al. (1997)
	3	17.6				13.5				ND				
Cooked	6	9.7	2.1	5.8	12.8	11.3	1.7	8.3	13.6	2.6	1.2	0.8	4.0	Eliassen et al. (2002) Bardócz et al. (1993)
	3	21.6				15.2				5.2				
Chips	4	3.9		ND	6.9	23.5		13.6	35					Ziegler, Hahn, and Wallnöfer (1994) Eliassen et al. (2002)
	4	8.5	2.3	5.6	12.4	10.9	2.2	9.1	15.7	2.2	1.2	ND	3.4	
Potato crisps	4	21.6				24.8				2.6				Bardócz et al. (1995)
Potato crisps	3			38.4	41.9			35.2	39.9			4.2	5.1	Bardócz et al. (1995)
<i>Vegetables</i>														
Cauliflower, fresh	3			3.1	4.5			21.7	27.8			2.0	2.8	Bardócz et al. (1993)
Cooked	7	4.9		2.2	7.6	31.2		17.1	42.8					Ziegler et al. (1994)
	5	5.3	2.1	3.3	8.9	28.3	6.5	21.3	39.3	6.1	1.6	4.6	8.9	Eliassen et al. (2002)
Broccoli, fresh	4	4.0	1.2	2.6	5.9	26.2	10.6	19.0	45.2	6.3	2.8	4.4	11.3	Eliassen et al. (2002)
	4	9.0		7.0	10.5	33.2		31.8	36.0					Ziegler et al. (1994)
Cooked	5	6.4	2.9	3.4	10.8	41.3	9.1	24.5	51.8	9.9	3.2	5.8	15.9	Eliassen et al. (2002)
	4	5.6	2.9	2.5	8.9	27.3	6.4	17.3	33.1	7.1	1.4	5.3	8.9	Eliassen et al. (2002)
Cabbage	3			0.4	1.6			3.2	5.1			3.2	3.6	Bardócz et al. (1993)
	4					14.4		13.2	16.6					Ziegler et al. (1994)
Sauerkraut	121	146	99.0	2.8	529	8.2	6.6	ND	47.0					Kalač, Špička, Křížek, Steidlová, and Pelikánová (1999)
Savoy	4					11.6		10.6	13.0					Ziegler et al. (1994)
Spinach, frozen purée	32	12.9		ND	119	7.3	3.8	1.3	15.4	2.2	1.8	ND	3.8	Kalač, Švecová, and Pelikánová (2002)
Cucumber	3	3.2				1.5				0.4				Bardócz et al. (1993)
	5	6.9	1.4	5.5	8.7	7.4	1.6	5.4	10.3	1.2	0.8	ND	2.8	Eliassen et al. (2002)
Carrot	3			1.2	1.8			7.7	8.3			2.0	2.8	Bardócz et al. (1993)
	4	2.8		2.0	3.9	4.5		4.3	4.7					Ziegler et al. (1994)
Tomato	2	3.5				8.0				ND				Okamoto et al. (1997)
	6	1.5	0.7	0.7	2.7	6.7	2.3	3.6	11.9	0.6	1.2	ND	3.8	Eliassen et al. (2002)
Concentrated tomato pasta	3			9.3	122			1.6	2.5	ND				Bardócz et al. (1993)
	2	10.6				1.7				ND				Okamoto et al. (1997)
Ketchup	19	25.9	8.2	7.9	41.1	8.4	3.7	ND	15.8			ND	2.9	Kalač et al. (2002)
Onion	24	52.5	54.1	ND	165	6.1	9.0	ND	33.4			ND	12.1	Kalač et al. (2002)
Lettuce	3			5.5	7.2			5.5	8.1			0.8	1.2	Bardócz et al. (1993)
Celeriac	3			3.3	4.8			4.2	8.3	ND				Bardócz et al. (1993)
	3	5.6	1.3	4.5	7.3	9.1	1.5	7.4	10.3	0.8	0.8	ND	1.8	Eliassen et al. (2002)
Asparagus	3	6.1		3.7	7.7	26.7		19.7	34.7					Ziegler et al. (1994)
Asparagus	3	2.9		2.0	3.8	10.3		9.2	10.9					Ziegler et al. (1994)
<i>Fruits</i>														
Apple	3			0.4	1.7			2.2	2.8	ND				Bardócz et al. (1993)
	2	ND				1.0				ND				Okamoto et al. (1997)
Pears	3			23.6	24.2			30.2	76.0			8.1	49.3	Bardócz et al. (1993)
Orange	3			95.1	140			8.8	9.7	ND				Bardócz et al. (1993)
	2	117				1.9				1.6				Okamoto et al. (1997)
Orange, canned	5	137	11.3	119	153	4.1	4.0	0.4	11.6	0.2	0.2	ND	1.4	Eliassen et al. (2002)
	3			27.0	30.0			0.7	1.0	ND				Bardócz et al. (1993)
Mandarin	10	122	44.2	67.3	200	2.3	1.3	ND	4.5	0.4	0.8	ND	3.0	Eliassen et al. (2002)

*n*, number of samples;  $\bar{x}$ , mean value;  $S_x$ , standard deviation; ND, content below detection limit.

**Tab. 4** Contenuto di poliammine (mg/Kg) in carne e pesce

Product	n	Putrescine				Spermidine				Spermine				Reference
		x	S <sub>x</sub>	x <sub>min</sub>	x <sub>max</sub>	x	S <sub>x</sub>	x <sub>min</sub>	x <sub>max</sub>	x	S <sub>x</sub>	x <sub>min</sub>	x <sub>max</sub>	
<i>Beef</i>														
Raw, lean	3			5.5	5.9			18.3	19.7			30.7	42.0	Bardócz et al. (1993)
	2	0.5				2.6				28.3				Okamoto et al. (1997)
	6					3.1	0.8	1.9	4.2	39.8	5.8	28.7	44.6	Hernández-Jover et al. (1997)
Ground	5	10.1	14.3	0.8	38.5	5.5	3.2	2.6	12.0	27.3	4.4	16.8	26.0	Eliassen et al. (2002)
	3	8.8						70.6	72.9			46.3	47.5	Bardócz et al. (1993)
Cooked	8	4.0	5.7	0.8	18.7	3.0	0.7	2.2	4.8	20.8	3.6	13.3	26.7	Eliassen et al. (2002)
	3			1.9	2.8			5.7	6.8			22.8	33.3	Bardócz et al. (1993)
Fried	2			1.4	30.2			2.6	5.7			26.1	36.2	Eliassen et al. (2002)
	6					1.5				30				Yano, Kataho, Watanabe, Nakamura, and Asano (1995)
Sirloin, raw	7	2.1	3.2	0.6	12.8	2.2	0.6	1.0	3.0	17.0	6.7	6.1	29.1	Eliassen et al. (2002)
<i>Pork</i>														
Raw, lean	3	3.1						2.9	4.9			30.1	70.3	Bardócz et al. (1993)
	2	1.1				4.6				28.3				Okamoto et al. (1997)
	13					3.0	1.0	0.8	4.5	33.5	4.4	27.3	40.6	Hernández-Jover et al. (1997)
Chops, raw	5	0.2	0.3	ND	0.7	2.8	0.7	2.0	4.1	22.4	7.5	14.5	34.5	Eliassen et al. (2002)
<i>Meat products</i>														
Sausage	3			13.8	14.5			5.8	6.4			24.0	25.9	Bardócz et al. (1993)
Sausage, wiener	5	0.9	0.3	0.4	1.1	2.3	0.7	1.2	3.5	9.9	2.0	5.0	12.5	Eliassen et al. (2002)
Mortadella (cooked salami)	20			ND	5.7	4.0	2.3	1.0	8.9	17.2	7.5	7.6	32.2	Hernández-Jover et al. (1997)
Pork ham, smoked	3			4.0	4.3			2.0	8.8			40.2	50.3	Bardócz et al. (1993)
Roasted	3	9.0				6.1						40.2	60.4	Bardócz et al. (1993)
Cooked	20			ND	12.4	2.1	0.6	1.4	3.5	21.4	8.4	6.4	35.7	Hernández-Jover et al. (1997)
Dry-cured	23			ND	17.4	5.6	0.9	4.4	7.3	35.7	8.2	24.9	62.1	Hernández-Jover et al. (1997)
Ripened dry fermented Spanish sausage "chorizo"	20			2.6	416	4.1	2.5	1.9	10.0	26.1	8.1	13.8	43.5	Hernández-Jover et al. (1997)
Different Spanish meat products	3			0.8	185			6.7	8.2			39.1	58.8	Ruiz-Capillas and Jiménez-Colmenero (2004)
	17			0.2	10			1.7	7.6			17.8	59.3	Ruiz-Capillas and Jiménez-Colmenero (2004)
<i>Game (stored at 4 °C for 7 days)</i>														
Roe deer	3	19.3	17.4			14.7	2.9			54.3	7.4			Dičáková et al. (2003)
Red deer	3	9.0	7.6			17.0	7.0			59.3	2.3			Dičáková et al. (2003)
<i>Fish</i>														
Cod, raw	3			26.4	29.7			1.0	1.6			3.0	6.5	Bardócz et al. (1993)
	9	1.4	0.9	0.5	3.1	0.6	0.9	ND	3.8	0.6	0.8	ND	2.2	Eliassen et al. (2002)
Salted	5	4.9	3.0	2.1	9.6	1.5	1.0	ND	2.5	2.6	1.6	ND	3.8	Eliassen et al. (2002)
Cod roe	6	90.9	17.8	79.3	129	13.6	4.2	7.8	18.8	20.0	6.5	9.9	26.9	Eliassen et al. (2002)
Salmon, raw	9	2.7	1.0	1.6	4.6	1.5	0.7	0.4	3.3	0.8	0.8	ND	3.2	Eliassen et al. (2002)
Mackerel, raw	7	2.4	0.7	1.3	3.5	2.9	0.9	1.6	4.1	3.0	2.4	ND	7.7	Eliassen et al. (2002)
In tomato, canned	5	7.4	2.1	3.9	9.7	3.0	1.2	1.4	4.4	1.4	1.4	ND	4.2	Eliassen et al. (2002)
Tuna, fresh	20			ND	4.8			1.2	11.7			7.3	37.0	Veciana-Nogués, Mariné-Font, and Vidal-Carou (1997b)
	38			ND	2.2			1.5	10.0			2.2	35.2	Veciana-Nogués et al. (1997b)
Anchovies, immersed in oil	10	5.6	7.1	1.3	25.4	5.4	1.6	1.9	8.0	7.9	1.6	5.3	10.3	Eliassen et al. (2002)
	3	5.0		2.3	7.6	2.2		2.1	2.3	7.7		7.5	7.9	Veciana-Nogués, Mariné-Font, and Vidal-Carou (1997a)
Crab, canned	2			110	134			1.2	1.5			2.0	2.2	Eliassen et al. (2002)
Trout	3			1.8	1.9			3.9	4.2			8.7	9.1	Bardócz et al. (1993)
Fish sauces (mg kg <sup>-1</sup> dry matter)	45			ND	1260									Stute et al. (2002)

**Tab. 5** Contenuto di poliammine (mg/Kg) in latte, formaggi e uova

Product	n	Putrescine				Spermidine				Spermine				References
		x	S <sub>x</sub>	x <sub>min</sub>	x <sub>max</sub>	x	S <sub>x</sub>	x <sub>min</sub>	x <sub>max</sub>	x	S <sub>x</sub>	x <sub>min</sub>	x <sub>max</sub>	
<i>Cow milk</i>														
Full cream	3	0.09				0.15 0.45				0.2 0.6				Bardócz et al. (1993)
Semi-skimmed	3	0.09 0.18				0.3 0.6				0.2 0.4				Bardócz et al. (1993)
Full cream	5					0.25 0.85				0.4 1.6				Motyl, Płoszaj, Wojtasik, Kukulska, and Podgurniak (1995)
Unspecified	5	ND				0.17 0.16 0.18				ND				Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, and Vidal-Carou (2000)
Reconstituted powdered	4					0.75				0.2				Santos, Souza, Cerqueira, and Glória (2003)
Yoghurt, plain	5	ND				ND 0.43				ND 0.34				Novella-Rodríguez et al. (2000)
	5	0.3	0.4	0	0.9	0.7	0.6	0	1.3	0.8	1.0	0	2.2	Eliassen et al. (2002)
<i>Cheeses</i>														
Cheddar, fresh	3	10.1 20.0				80.8 109				23.8 39.2				Bardócz et al. (1993)
Cheddar, matured	3	653				197 202				23.2 40.0				Bardócz et al. (1993)
Camembert	2	ND				<1.5				ND				Okamoto et al. (1997)
Gouda	2	ND				ND				ND				Okamoto et al. (1997)
Blue, Japanese	2	6.7				20.3				ND				Okamoto et al. (1997)
Blue, Norwegian	3	16.4	2.7	12.6	20.2	23.8	4.1	20.2	29.3	0.4	0.8	0	2.0	Eliassen et al. (2002)
Unripened, Spanish	10	ND 1.4				0.39 0.82				ND 1.12				Novella-Rodríguez et al. (2000)
Ripened, Spanish	10	ND 612				ND 43.0				ND 18.7				Novella-Rodríguez et al. (2000)
Unripened, Spanish	20	ND 3.1				ND 0.8				ND 1.1				Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, Izquierdo-Pulido, and Vidal-Carou (2003)
Hard-ripened from raw milk, Spanish	20	ND 670				ND 39.6				ND 21.5				Novella-Rodríguez et al. (2003)
Hard-ripened from pasteurised milk, Spanish	20	ND 612				ND 43.0				ND 18.7				Novella-Rodríguez et al. (2003)
Blue, Spanish	20	3.0 257				ND 71.6				ND 18.9				Novella-Rodríguez et al. (2003)
Goat, Spanish	20	ND 192				ND 14.5				ND 3.6				Novella-Rodríguez et al. (2003)
<i>Human breast milk</i>														
		0.02				0.32 0.09				0.63 0.03				Buts, De Keyser, De Deraemaeker, Collette, and Sokal (1995)
<i>Eggs, boiled</i>														
	3	0.26 0.35				0 0.15				0.2 0.6				Bardócz et al. (1995)
	2	<0.4				<1.4				<1.1				Okamoto et al. (1997)

Le ammine hanno delle ripercussioni sulle caratteristiche sensoriali degli alimenti, spesso alterano il gusto in maniera sgradevole e sono rare quelle che apportano una nota piacevole. La  $\beta$  - feniletilammina ha un odore di pesce, la butilammina un odore ammoniacale, l'etilammina un odore farmaceutico, l'hexylammina un gusto d'erba.

Le ammine biogene possono avere rilevanza nel determinare insieme agli amminoacidi l'aroma del formaggio, ma la loro importanza è legata soprattutto agli effetti che possono avere sulla salute umana. L'analisi delle ammine biogene negli alimenti è quanto mai necessaria a stabilire i potenziali rischi sulla salute del consumatore, ma anche a fornire dati su imprescindibili requisiti di qualità. Un altro aspetto molto importante connesso con la tossicità di queste sostanze è da individuare nelle abitudini alimentari del consumatore. La combinazione e la quantità di prodotti assunti in un pasto, in particolare riferite ad alimenti fermentati come salami, vino, birra, formaggi e verdure, possono rivestire un significato determinante, legato alla simultanea introduzione nell'organismo di quantità complessive elevate di ammine biogene e conseguente possibile insorgenza di fenomeni tossici come la formazione di nitrosammine cancerogene..

## **Formazione di nitrosammine**

Durante la preparazione, lo stoccaggio, la cottura e la digestione degli alimenti, le ammine biogene, possono dare luogo (sia direttamente, sia come precursori di altri composti) a delle nitrosammine sospettate di essere cancerogene, per reazione con degli agenti nitrosanti come i nitrati, i nitriti e gli ossidi d'azoto. Il pericolo maggiore sembra risultato dall'azione che hanno questi sali sulla putrescina e cadaverina quando sono aggiunti alla carne durante la salatura. Il riscaldamento converte la putrescina e la cadaverina rispettivamente in pirrolidina e in piperidina, poi trasforma queste ultime in N-nitroso pirrolidina e N-nitroso piperidina che sono cancerogene; la formazione di queste nitrosammine è favorita dalla salatura, dall'affumicatura e dalla frittura (Doyle et al.1993).

Anche nell'organismo umano le ammine ingerite sono trasformabili in nitrosammine nello stomaco, sotto l'azione dei nitriti (Lijnsky et al. 1980). Questo per effetto della dimetilammina che diventa N-nitrosodimetilammina. È possibile che i batteri Escherichiacoli siano capaci di nitrosare le ammine nell'intestino a un pH neutro.



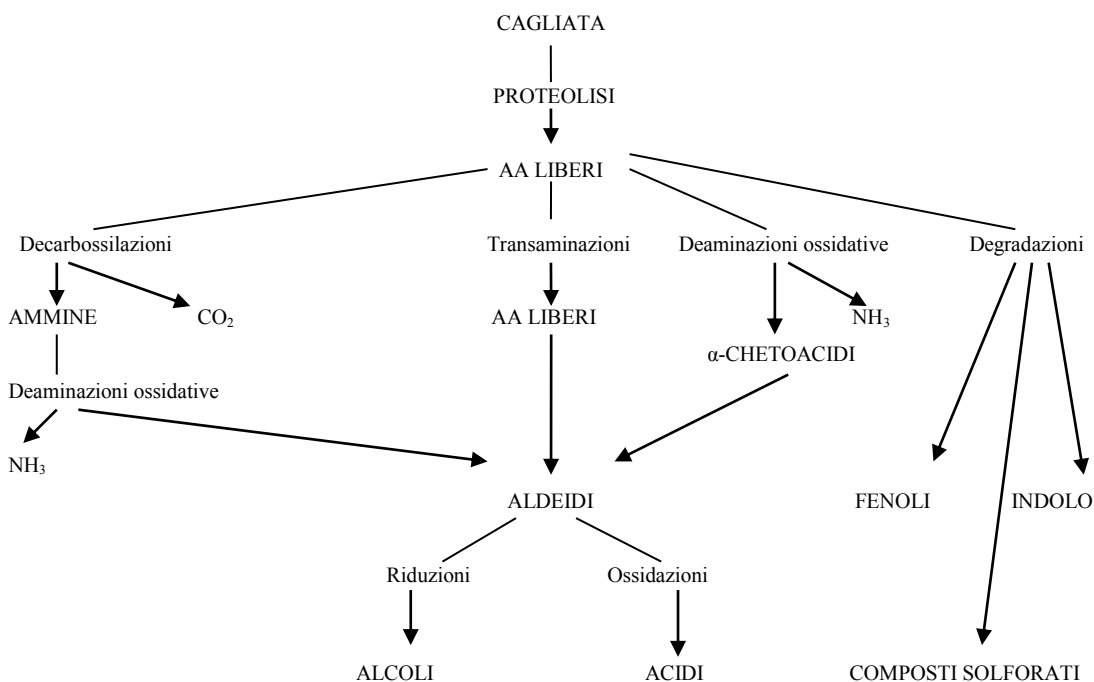
## Formazione di ammine biogene nel formaggio

Il formaggio è tra gli alimenti fermentati, quello più comunemente associato alla contaminazione di ammine biogene.

Esso rappresenta, di fatto, un substrato ideale per la loro formazione in quanto la sua preparazione comporta innanzitutto disponibilità di aminoacidi liberi come risultato della proteolisi a carico delle caseine, il principale componente della cagliata, di eventuali microrganismi decarbossilasi-positivi e condizioni ambientali che permettano la loro crescita, nonché di specifici cofattori enzimatici (Stratton et al., 1991).

Gli aminoacidi liberi, ad'opera di decarbossilasi e deamminasi, vengono trasformati rispettivamente in ammine biogene e in  $\alpha$ -chetoacidi, entrambi degradati ad aldeidi, alcoli e acidi (Fig. 6).

**Fig. 6 : Catabolismo microbico degli aminoacidi durante la maturazione del formaggio (Montedoro, 1985).**



Nei formaggi sono state ritrovate numerose ammine, soprattutto istamina, putrescina, cadaverina, spermidina e spermina (Silla Santos et al., 1996). I fenomeni degradativi degli amminoacidi che portano alla formazione di tali composti nei formaggi, sono diversi a causa delle differenti microflora e di conseguenza delle diverse attività enzimatiche.

I ceppi microbici presenti nei formaggi con attività decarbossilasica e quindi capaci di produrre ammine, appartengono a diversi generi tra i quali *Proteus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Klebsiella* ed *Escherichia*. Anche tra i batteri lattici *Lactobacillus bulgaricus*, *L. buchneri*, *L. brevis* e *L. plantarum* vi sono ceppi capaci di attività decarbossilasica.

In generale i microrganismi mostrano attività decarbossilasica specie-specifica, poiché possiedono l'enzima specifico per ciascun amminoacido.

Studi condotti su enterobatteri in formaggi contenenti alte quantità di questi microrganismi, rivelano una maggiore attività decarbossilasica nei confronti della lisina con conseguente produzione di cadaverina (Marino et al. 2000).

Per contro Enterococchi isolati da un semicotto caprino hanno mostrato attività decarbossilasica maggiore nei confronti di tirosina e fenilalanina come substrati, di conseguenza si rivelano produttori di tiramina e  $\beta$ -fenilettilamina (Galgano et al. 2001).

Inoltre una concentrazione elevata di Enterobacteriaceae nel formaggio blue-veined può essere correlata con alti contenuti di cadaverina e di putrescina (Marino et al. 2000).

Tali microrganismi possono essere presenti nel latte, essere introdotti per contaminazione durante il processo di caseificazione, oppure aggiunti come colture starter (Halasz et al. 1994).

Tuttavia, è difficile trovare una correlazione diretta tra il numero di microrganismi ed il contenuto di ammine biogene, poiché la capacità di produrre amine da parte dei diversi ceppi varia notevolmente (Innocente e D'Agostin, 2002; Schirone *et al.*, 2011).

I principali fattori che condizionano la produzione di ammine biogene nei formaggi, oltre la disponibilità di amminoacidi, sono infatti la qualità e il trattamento del latte, temperatura di stoccaggio, stagionatura, 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.

Pertanto, se una certa quantità di ammine biogene deriva inevitabilmente dai normali processi di stagionatura, quantità particolarmente elevate di alcune di esse si possono trovare in concomitanza di difetti dovuti a fermentazioni anomale o a causa di elevati inquinamenti di origine ambientale.

L'utilizzo di materie prime di buona qualità igienico-sanitaria e la stretta osservanza delle buone pratiche di lavorazione costituiscono condizioni imprescindibili per il controllo dello sviluppo dei microrganismi e della loro attività enzimatica, particolarmente "vivace" durante i processi fermentativi, che rappresentano una fase fondamentale nella produzione dei formaggi (Antolini *et al.*, 1999).

Dalle ricerche svolte sul formaggio Emmental realizzato con latte definito di buona qualità, media qualità, bassa qualità dal punto di vista batteriologico, si è evidenziato che il formaggio prodotto con il latte migliore ha un basso contenuto di ammine anche dopo una prolungata stagionatura (Vincentini *et al.* 2006).

In studi svolti su formaggi montani (Innocente et al. 2000) si è rilevato che, a causa delle precarie condizioni igieniche, il contenuto delle ammine biogene è risultato elevato, in particolare si sono trovati valori di putrescina e cadaverina pari a 1,398 mg/kg.

Numerosi autori affermano che la pastorizzazione del latte ha un ruolo fondamentale per la riduzione del contenuto di ammine biogene (Vincentini et al. 2006).

E' soprattutto nei formaggi tradizionali a latte crudo, infatti, che le ammine biogene si accumulano a concentrazioni elevate (Martuscelli et al., 2005; Pintado et al., 2008; Schirone et al., 2011).

In una ricerca svolta sul formaggio Toma, su campioni prodotti con latte fresco e latte pastorizzato, si è verificato che il contenuto delle ammine è correlato alla presenza di varietà mesofile e termofile. Dai risultati ottenuti si è potuto accertare che quando si utilizza latte fresco sembra che le varietà mesofile favoriscono la formazione di cadaverina, mentre, se si utilizza latte pastorizzato, la presenza di varietà termofile determina una concentrazione inferiore di questa ammina nel formaggio.

Per quanto riguarda l'istamina se si utilizza latte fresco piuttosto che latte pastorizzato, la presenza di varietà mesofile provoca una riduzione del contenuto di questa ammina. Anche la concentrazione di tiramina e putrescina diminuisce in corrispondenza dell'utilizzo del latte fresco quando sono presenti varietà mesofile. Al contrario quando si utilizza latte pastorizzato il tipo di varietà batteriche mesofile, o termofile, non influenza la concentrazione di queste ammine. (Gennaro et al. 2003). Kebary et al., hanno studiato l'effetto della variazione di ammine utilizzando latte pastorizzato a differenti temperature. La pastorizzazione del latte tra 75 e

80°C riduce la formazione di amminoacidi liberi e, di conseguenza, si ha una diminuzione del contenuto di ammine biogene.

Bisogna aggiungere che alcune decarbossilasi non sono inattivate durante la pastorizzazione e che la maggior parte delle ammine, compresa l'istamina, sono termostabili; la conseguenza è che una volta formate le ammine biogene non saranno distrutte nel corso delle tappe di trasformazione degli alimenti anzi potrebbero aumentare.

Uno dei motivi per i quali la pastorizzazione contribuisce a ridurre la concentrazione delle ammine nei formaggi è che essa influenza il contenuto di piridossal fosfato, cofattore degli enzimi decarbossilasi, il quale, essendo termolabile, è inattivato dal calore.

Un altro fattore da tenere in considerazione per la formazione di ammine biogene è la temperatura nei locali di stagionatura che influenza favorevolmente la proteolisi e lo sviluppo batterico. Numerosi studi mostrano come il contenuto di ammine biogene varia anche in funzione del periodo di stagionatura del formaggio. La concentrazione delle principali ammine trovate nei formaggi in genere aumenta in relazione all'aumento del periodo di stagionatura (Vincentini et al., 2006).

Nella tabella 6 sono riportati i dati bibliografici relativi al contenuto di ammine in differenti tipologie di formaggi.

Un altro parametro importante che influenza la produzione di ammine biogene è il pH della matrice; infatti, è generalmente accettato che le vie di decarbossilazione sono attivate per aumentare la resistenza delle cellule a condizioni di sviluppo acide, per mantenere l'omeostasi del pH cellulare (Wolken et al., 2006).

L'attività degli enzimi decarbossilasi aumenta quando il valore di pH è compreso tra valori di 4 e 5.5 e diminuisce con valori di pH più bassi, probabilmente a causa di un'inibizione dell'attività batterica. Anche la salagione gioca un ruolo importante nell'influenzare la produzione di ammine biogene. In generale è interessante notare come la produzione di ammine biogene è ridotta da un'elevata concentrazione di NaCl e da bassi valori di pH, mentre un aumento del pH e la riduzione della salinità induce un rapido aumento di produzione di ammine biogene. Il cofattore dell'enzima decarbossilasi è generalmente il piridoxal fosfato o piridossina, specifico per L-amminoacidi, che esplica la sua massima attività intorno a pH 5,5. Alcuni autori hanno però trovato in un ceppo di *Lactobacillus* sp., una istidino-decarbossilasi che non richiede il piridoxal fosfato.

Studi condotti su ceppi di streptococchi sp. del gruppo D, hanno evidenziato che tutti i ceppi possiedono la tirosino-decarbossilasi, attiva a pH 5,6 e che solamente il 10% possiedono la glutammico-decarbossilasi, attiva invece a pH 4,4 (Montedoro et al., 1985).

La decarbossilazione di lisina, leucina e acido glutammico ad' opera di *Brevibacterium linens* è significativa tra pH 5,0 e 7,0 a 30°C (Hemme et al., 1982).

Il numero di microorganismi presenti nella materia prima rimane, comunque, uno dei fattori critici; per cui il controllo delle ammine biogene è spesso legato alla prevenzione dello sviluppo o dell'attività metabolica di quei microorganismi responsabili della loro formazione, mediante diverse processi tecnologici, come il riscaldamento, la salagione, l'aggiunta di spezie ed altro (Mah et al., 2009).

Un altro importante fattore suggerito, per prevenirne l'accumulo, è il controllo dei microrganismi produttori di queste sostanze attraverso l'uso di colture starter non producenti ammine biogene (Bover-Cid et al., 2000; Dapkevicius et al., 2000).

Tuttavia, non tutti gli studi sono riusciti a dimostrare l'efficienza delle colture starter per ridurre queste sostanze.

Certamente un rapido ed intenso abbassamento del pH può spesso ridurre lo sviluppo dei microrganismi produttori all'inizio del processo fermentativo (Maijala et al., 1995).

Tecnologie innovative utilizzate per ridurre il contenuto di ammine biogene nei prodotti caseari, quali l'uso dell'alta pressione pulsata (PSW) o l'alta pressione di omogeneizzazione (HPH) hanno dato risultati promettenti per quanto riguarda la possibilità di inattivare microrganismi a temperatura ambiente o meno, anche per un ampio spettro di specie batteriche (Novella-Rodriguez et al., 2002; Lanciotti et al., 2007; Naila et al., 2010).

Anche se, in genere, i livelli rilevati sono al di sotto dei valori ritenuti tossici, il problema della presenza di ammine nei formaggi 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 (Novella-Rodriguez et al., 2004). Alcuni Paesi (Svizzera) hanno stabilito limiti massimi nei formaggi fino a 1000 mg/Kg

(somma di istamina, tiramina, putrescina, cadaverina e 2- feniletilammina)  
(Carniel et al., 2000).

La tabella che segue riporta dati bibliografici relativi al contenuto di ammine e amminoacidi in differenti tipologie di formaggi analizzati negli ultimi anni.

**Tab. 6 Contenuto di ammine biogene espressi in mg/Kg in alcuni formaggi nazionali ed esteri**

	<b>His</b>	<b>Tir</b>	<b>Put</b>	<b>Cad</b>	<b>Trip</b>	<b>β-fen</b>	<b>Spd</b>	<b>Spm</b>
<b>Parmigiano (Halasz, 1994)</b>	272	64	43	98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Emmental (Halasz, 1994)</b>	n.d.	132	96	96	n.d.	75	n.d.	n.d.
<b>Pecorino pugliese (Celano,1996) (6 mesi di stagionatura)</b>	166	55	30	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Gorgonzola (Martelli,1997)</b>	214	168	n.d.	n.d.	7.07	112	n.d.	n.d.
<b>Feta (Valsamaki,2000) (3 mesi di stagionatura)</b>	84.06.00	246	193	82.08.00	6.24	7.04	n.d.	n.d.
<b>Blue-veined (Marino,2000)</b>	0.8-20.2	8.3-58.4	10.1- 60.4	12-190	2.1- 5.4	0.8-1.5	6.2- 17.2	0.5-1
<b>Azeitao (Pinho,2000)</b>	414-644	122-358	15-110	181-231	n.d.	n.d.	n.d.	47-81
<b>Romadour (Standara,2000)</b>	12.2- 15.8	246-272	164-191	85-89	4.3- 4.8	n.d.	11- dic	2.7- 3.3
<b>Gouda olandese (Tiecco,2000)</b>	77	65	13	97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Gouda tedesco (Tiecco,2000) (3 mesi di stagionatura)</b>	33.35.00	352.06.00	52.09.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.



## **MATERIALI E METODI**

## **Campionamento**

### ***Latte***

Lo studio ha riguardato 69 campioni di latte di capra di razza Sarda e Maltese prodotti in due allevamenti (A e B) situati nel centro-nord della Sardegna.

I due allevamenti si differenziavano per l'alimentazione degli animali: nell'allevamento A era prevalentemente al pascolo (6h/giorno in primavera- 12h/giorno in estate), disponibile in maniera regolare e costante, costituito da prato polifita di erbe spontanee ed erbaio di graminacee e leguminose (loietto e trifoglio). L'alimentazione al pascolo è stata integrata con somministrazione regolare e costante di fieno (naturale polifita, foraggio di medica) e concentrati (mais, semi di soia e barbabietola). Per gli animali dell'allevamento B l'alimentazione era prevalentemente al pascolo (circa 12h durante tutta la lattazione) con significativa presenza di macchia mediterranea. L'integrazione al pascolo è stata fatta con notevole apporto di concentrati (mais, barbabietola e avena) e con fieno la cui disponibilità era però limitata ed incostante.

Dall'allevamento A il latte è stato prelevato da 6 animali di razza Maltese e da 6 di razza Sarda, mentre nell'allevamento B sono stati considerati 5 animali di razza Maltese e 6 di razza Sarda. Da ogni animale sono stati effettuati 3 prelievi nel corso della mungitura della sera, nei mesi di febbraio, maggio e giugno.

## ***Formaggi***

Sono stati analizzati gli amminoacidi liberi e le ammine biogene in formaggi tradizionali prodotti in Sardegna da latte di pecora di razza Sarda.

I campioni presi in esame appartengono alle seguenti tipologie:

- Pecorino Sardo DOP (CE, 1996): presso caseifici del Nord Sardegna sono stati prelevati 13 campioni con grado di maturazione da 30 - 360 giorni. Il Pecorino Sardo è un formaggio a pasta semicotta prodotto con latte termizzato inoculato con una coltura starter e coagulato con caglio di vitello. La stagionatura avviene in locali con temperatura (tra i 6 - 12 ° C) e umidità relativa (tra l'80 - 95%) tenute sotto controllo.
- Pecorino stagionato del pastore: Sono stati prelevati 12 campioni con grado di maturazione da 60 - 360 giorni, in mini-caseifici ubicati presso le stesse aziende zootecniche. Si tratta di un formaggio a pasta semicotta prodotto con latte crudo, senza aggiunta di colture starter e coagulato con caglio di vitello. La stagionatura avviene in locali con umidità e temperatura non controllati.
- Casu Marzu: sono stati analizzati 9 campioni con grado di maturazione tra 60 - 90 giorni. Il Casu Marzu, chiamato anche casu modde, casu cundídu, o casu fràzigu in lingua sarda, o in italiano “formaggio marcio” , è un formaggio prodotto con l'uso di larve della mosca casearia *Piophilidae*. Si prepara in estate, quando le temperature elevate favoriscono il ciclo vitale della mosca, a partire da formaggio di pecora che i produttori mettono nelle stanze più calde dello stabilimento o allo scoperto, dopo aver fatto dei piccoli buchi sul formaggio allo scopo di ammorbidire la crosta e attirare l'insetto. Dopo 60 - 90 giorni di stagionatura il formaggio è pronto per il consumo

## **Reagenti**

Gli aminoacidi e le ammine tiramina, triptamina, cadaverina, putrescina, istamina e  $\beta$ -feniletilammina sono state fornite dalla ditta Fluka (Buchs, Svizzera), come anche il dansil cloruro, l'ammonio acetato e l'acido 3,3'-tiodipropionico (TDPA), mentre le altre ammine dalla ditta Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Srl, MI, Italia). Il carbonato di sodio, l'acido cloridrico, l'acetonitrile e l'acido acetico sono stati forniti dalla ditta Carlo Erba (Rodano, MI, Italia).

## **Preparazione delle soluzioni standard**

La determinazione in HPLC degli aminoacidi liberi e delle ammine biogene nei formaggi è stata effettuata utilizzando una soluzione standard contenente L-alanina, L-arginina, acido L-aspartico, L-cisteina, L-glicina, acido L-glutammico, L-istidina, L-isoleucina, L-leucina, L-triptofano, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina, L-valina, acido  $\gamma$ -amminobutirrico, ornitina, agmatina, serotonina, octopamina, tiramina, triptamina, istamina cadaverina, putrescina,  $\beta$ -feniletilammina, spermina e spermidina.

Per la costruzione della retta di taratura si sono utilizzati soluzioni contenenti tutti gli aminoacidi e le ammine istamina, agmatina e serotonina, (gruppo A) alle concentrazioni comprese tra 1 e 100  $\mu$ M.

Per le restanti ammine biogene triptamina,  $\beta$ -feniletilammina, putrescina, cadaverina, tiramina, spermidina, spermina e isopentilammina (gruppo B) la concentrazione è compresa tra 0.1 e 10  $\mu$ M.

Per i campioni di latte le soluzioni standard di taurina utilizzate per la retta di taratura avevano concentrazioni comprese tra 1 e 100  $\mu$ M.

Le soluzioni standard sono state preparate in HCl 0,1 N contenente 0.2% di acido tiodipropionico, e conservate in freezer a -20°C fino all'utilizzo. L'uso di un antiossidante come l'acido tiodipropionico (TDPA), come previsto da Krause et al. (1995), evita l'ossidazione di aminoacidi solforati come cisteina e metionina.

### **Estrazione della taurina dal latte**

A 2 ml di latte sono stati addizionati 20 ml di HCl 0,3 N. La miscela ottenuta è stata sottoposta ad agitazione magnetica per 30 min e centrifugata a 10000 rpm per 10 min a 4°C. Il surnatante è stato recuperato e filtrato con filtri di carta 40 Whatman. Per l'analisi in HPLC 400 µl dell'estratto sono stati derivatizzati con Dansyl-Cl.

### **Estrazione degli aminoacidi liberi e delle ammine biogene dai formaggi.**

Ad un grammo di formaggio grattugiato sono stati addizionati 20 ml di HCl 0,1 N contenente 0.2% di acido tiodipropionico (TDPA). La miscela dopo esser stata sottoposta per 5 minuti ad omogeneizzazione con Ultra-Turrax (10.000 giri/min) è stata centrifugata a 4000 rpm per 20 min a 4°C. Il surnatante è stato recuperato, ed il residuo è stato estratto una seconda volta usando la stessa procedura. I due estratti acidi sono stati uniti, portati al volume di 50 ml con HCl 0,1 N e filtrati con filtri a membrana da 0,22 µm (Millipore). Per l'analisi in HPLC 400 µl dell'estratto sono stati derivatizzati con Dansyl-Cl.

## Derivatizzazione dei composti azotati con Dansyl-Cl

Il Dansyl Cloruro reagisce con ammine primarie e secondarie, come pure con gruppi fenolici. Il cloro del derivatizzante viene sostituito ed il resto della molecola sostituisce un idrogeno del gruppo amminico. La reazione porta alla formazione dei corrispondenti Dansyl-derivati che risultano fluorescenti ed assorbono nell'UV-VIS. Perché la reazione avvenga sono necessari: uno ione idrogenocarbonato per neutralizzare l'acido cloridrico che si libera; temperatura di reazione 60-70°C; tempo di reazione 20 min. (Mentasti).

La reazione principale è schematizzata in figura 7

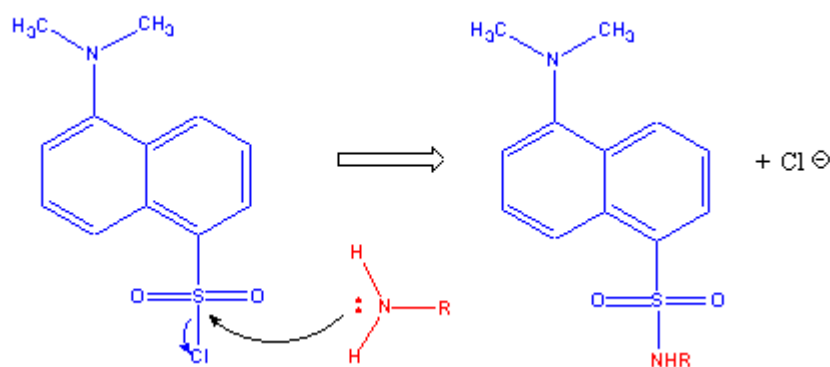


Fig. 7. Reazione di derivatizzazione

Tutti i campioni esaminati sono stati addizionati con Dansyl cloruro (2 % in acetone), una soluzione satura di carbonato di sodio e acetonitrile. Dopo agitazione manuale i vials sono stati posti in un termostato a 60°C per 20 minuti. Per spegnere la reazione di derivatizzazione sono stati addizionati con una soluzione acquosa di asparagina e riposti al buio per 15 minuti. Successivamente è stato aggiunto acido acetico glaciale per rimuovere l'eccesso di carbonato. Dopo un tempo di circa 5 minuti, necessari a

permettere l'eliminazione della CO<sub>2</sub> formatasi, le soluzioni sono state filtrati con filtri a membrana da 0,2 µm e 10 µl sono stati prelevati ed iniettati in HPLC.

### **Strumentazione utilizzata**

Le analisi sono state eseguite, utilizzando uno strumento HPLC della ditta Varian (Walnut Creek, CA, USA), munito di un sistema di pompe a tre solventi con controllo di gradiente (ProStar 230), un autocampionatore AI 200 Rainin, e un rivelatore fluorimetro LC 305 (Linear Instruments, Reno, NV, USA). Per il controllo del sistema è stato utilizzato il software Varian Star Chromatography Workstation (Version 4.5).

Per la separazione simultanea degli amminoacidi liberi e delle ammine biogene nei formaggi è stata utilizzata una colonna C<sub>18</sub> a fase inversa Alltima della ditta Alltech (3 µm, 150 x 4,6 mm), termostatata a 45°C; mentre per la separazione del derivato dansilato della taurina nel latte è stata utilizzata una colonna C<sub>18</sub> a fase inversa Kinetex (3 µm, 150 x 4,6 mm), termostatata a 45°C.

### ***Condizioni cromatografiche utilizzate per il latte***

Per la determinazione della taurina nel latte sono state utilizzate le stesse fase mobili impiegate per i formaggi.

Per la separazione del derivato dansilato della taurina è stato utilizzato il seguente gradiente di eluizione:

tempo = 0, A:B (10:90), flusso = 1 mL min<sup>-1</sup>; tempo = 12 min, A:B (20:80),  
flusso = 1 mL min<sup>-1</sup>; tempo = 13 min, A:B (100:0), flusso = 1 mL min<sup>-1</sup>  
tempo = 14 min, A:B (100:0), flusso = 2 mL min<sup>-1</sup>; tempo = 15 min, A:B

(10:90), flusso = 1 mL min<sup>-1</sup>. Dopo ogni analisi è stato effettuato un ciclo di lavaggio di 10 min con il 100% fase B. Dopo ogni analisi sono stati considerati 5 minuti di equilibratura del sistema.

### ***Condizioni cromatografiche utilizzate per i formaggi***

Gli amminoacidi liberi e le ammine biogene sono state determinate mediante il metodo cromatografico descritto da Minocha & Long, 2004, adattato alle nostre condizioni cromatografiche, che prevede l'utilizzo di due fasi mobili: tampone di ammonio acetato a pH 5,9 contenente il 3% di 2-propanolo (fase A) ed acetonitrile al 100% (fase B).

Per la separazione dei derivati dansilati è stato utilizzato il seguente gradiente di eluizione:

tempo = 0, A:B (10:90), flusso = 0.5 mL min<sup>-1</sup>; tempo = 1 min, A:B (10:90), flusso = 0.5 mL min<sup>-1</sup>; tempo = 50 min, A:B (65:35), flusso = 0.5 mL min<sup>-1</sup>; tempo = 65 min, A:B (100:0), flusso = 0.5 mL min<sup>-1</sup>; tempo = 66 min, A:B (100:0), flusso = 2 mL min<sup>-1</sup>; tempo = 70 min, A:B (10:90), flusso = 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Dopo ogni analisi sono stati considerati 5 minuti di equilibratura del sistema.

### ***Calibrazione***

L'identificazione dei picchi relativi a ciascun composto azotato considerato è stata realizzata sia mediante l'aggiunta dei singoli standard all'estratto del campione, sia attraverso la comparazione dei tempi di ritenzione dei componenti la miscela standard. L'analisi quantitativa dei singoli composti è stata fatta attraverso la costruzione di rette di taratura (metodo dello



standard esterno), imponendo nella regressione il passaggio per l'origine, avendo precedentemente accertato che il valore dell'intercetta non differiva significativamente dallo zero entro il livello di confidenza del 95%.

### **Analisi per la determinazione della composizione del latte**

Per ciascun campione di latte è stata determinata la quantità di latte prodotto al giorno, il contenuto in cellule somatiche (CCS) mediante citometria di flusso (FossoMatic; FOSS, Hillerød Dk), il contenuto in proteine, grassi e lattosio mediante analizzatore nel medio infrarosso con trasformata di Fourier (MilkoScan; FOSS, Hillerød Dk).

### **Analisi statistiche**

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software SPSS 14 (SPSS Inc., Chicago, Il, USA). Per valutare le correlazioni tra i diversi parametri analizzati è stata utilizzata l'analisi di correlazione di Pearson. La correlazione è stata considerata significativa al livello di  $p=0,01$ . Nel caso del latte, sono state applicate anche analisi univariate e multivariate. Per il confronto tra le medie è stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA). Quando si riscontra un valore di F significativo, per individuare quali sono le medie diverse tra loro, si è applicato il test di Tukey ad un livello di confidenza del 95%. Per valutare la presenza di gruppi (clusters) nel set di dati a disposizione, descritti da un certo numero di variabili, si è utilizzata l'analisi cluster gerarchica utilizzando il concetto di similarità. Questa procedura consente di identificare gruppi di casi relativamente omogenei in base alle variabili selezionate, utilizzando un algoritmo che inizia con ciascun oggetto in un cluster distinto e che combina i cluster in base alla

misura della distanza (tanto più due oggetti sono vicini tanto più sono simili), fino a quando ne rimane solo uno. I vari passi di accorpamento dei gruppi sono visualizzabili in un grafico detto dendrogramma. La cluster gerarchica è stata effettuata utilizzando come metodo di raggruppamento il legame medio fra i gruppi e la misura usata è la distanza euclidea quadratica. Per la standardizzazione dei dati si è utilizzato il metodo punteggi z.

**RISULTATI**  
**E**  
**DISCUSSIONI**

## **Validazione del metodo**

Il metodo in HPLC utilizzato per la determinazione degli amminoacidi liberi e delle ammine biogene nei formaggi e della taurina nel latte ha consentito una buona separazione dei composti considerati, come mostrato nei cromatogrammi riportati nelle figure 8 e 9 relativi ad una soluzione standard, ad un campione reale e fortificato rispettivamente di formaggio e latte.

Per la validazione del metodo sia per i formaggi che per il latte sono stati considerati i limiti di rilevabilità e quantificazione, la linearità, la ripetibilità ed il recupero (Tab.7).

I valori dei limiti di rilevabilità (LOD Limit Of Determination) e di quantificazione (LOQ Limit Of Quantification ) sono stati valutati sulla base della deviazione standard  $s$  delle fluttuazioni della linea di base, calcolata su dieci bianchi applicando le seguenti formule:

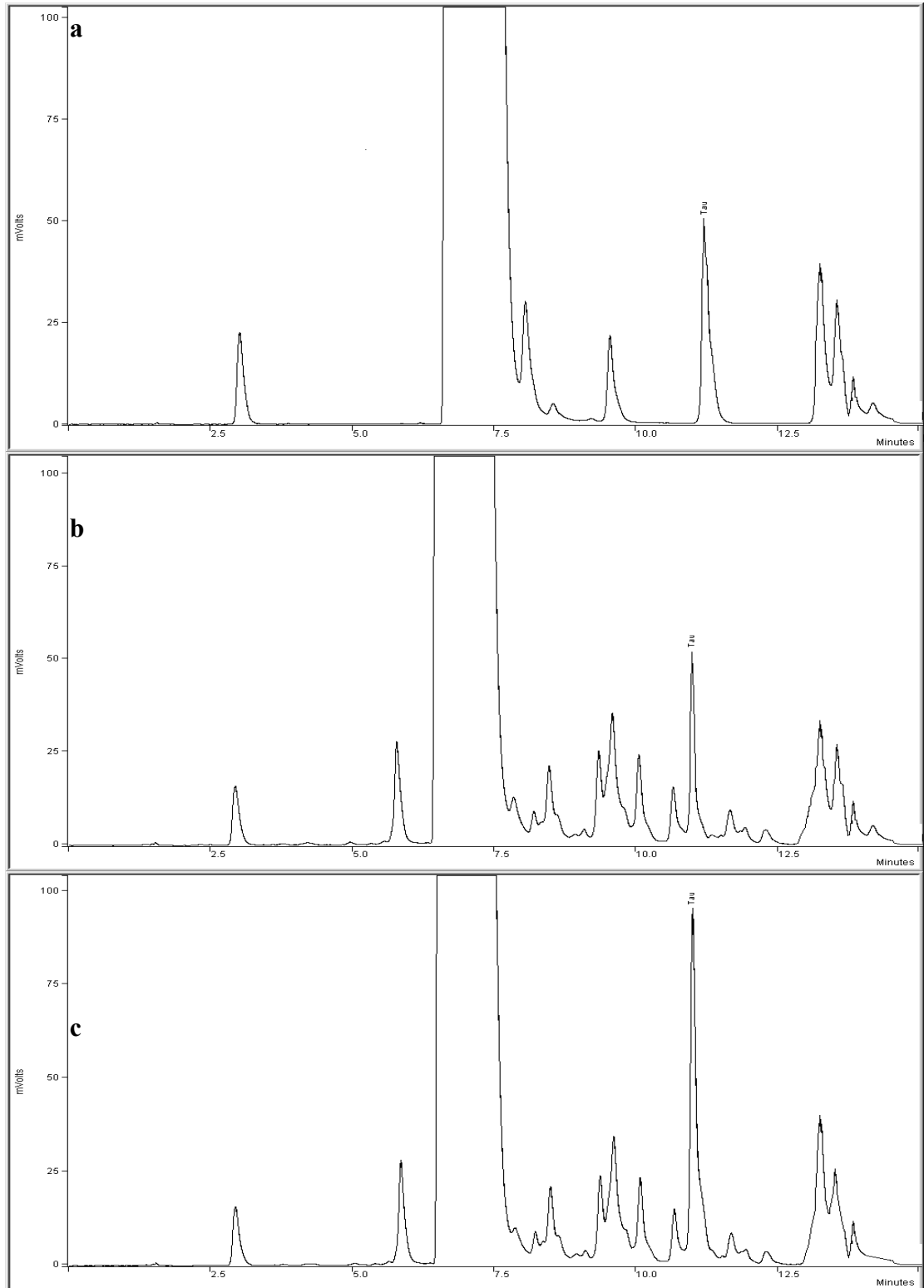
$$\text{LOD} = 3 s / p \qquad \text{LOQ} = 10 s / p$$

dove  $p$  è la pendenza della retta di regressione dello specifico analita. I valori trovati per questi parametri sono confrontabili con quelli riportati in letteratura (Minocha et al, 2004)).

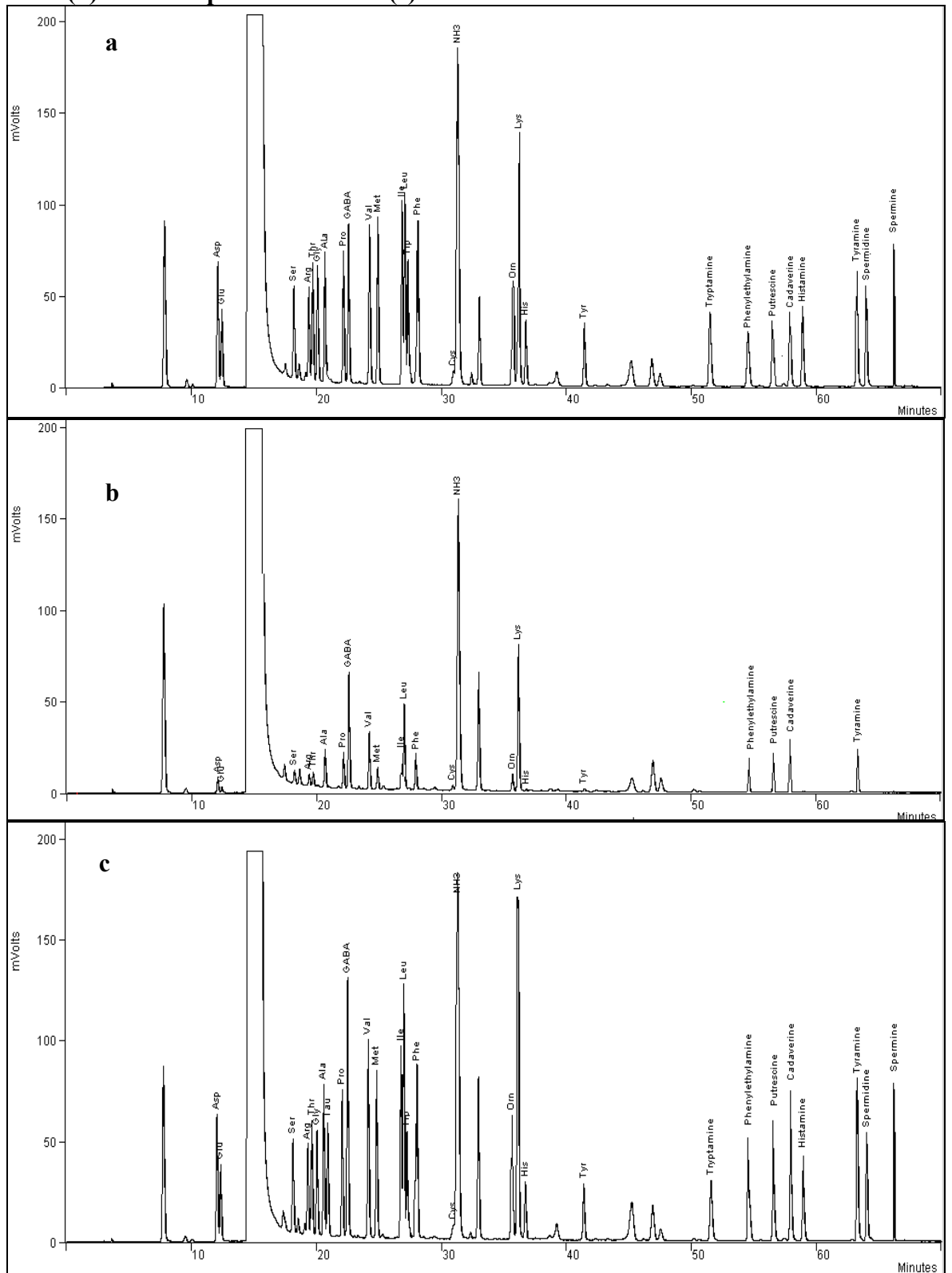
I valori relativi alla ripetibilità, stimata sulla base del valore del coefficiente di variazione (CV %) delle misure ottenute analizzando 6 volte lo stesso campione fortificato con una quantità nota di standard.

Il recupero (%), è stato valutato per ogni analita fortificando il campione reale con una quantità nota di standard. Il recupero varia per tutti i campioni in un range compreso tra 91 e 107%, dimostrando che il metodo di estrazione non consente la perdita di analita.

**Figura 8. Latte: Cromatogramma dello standard (a); del campione reale (b) e del campione fortificato (c)**



**Figura 9. Formaggio: Cromatogramma dello standard contenente le sostanze del gruppo A alla concentrazione 50  $\mu$ M e quelle del gruppo B 5 $\mu$ M (a); del campione reale (b) e del campione fortificato (c)**



**Tabella 7: Regressione lineare, limiti di determinazione, di quantificazione, recupero e ripetibilità**

FORMAGGIO Analita	Pendenza retta passante per l'origine = area picco / quantità iniettata (mV · s) / ng iniettati		R <sup>2</sup>	RSD%	LOD (ng)	LOQ (ng)	Recupero %	Ripetibilità CV%
Asp	3,40	0,917	10	0,9	1,5	96	1,3	
Glu	3,78	0,935	8	0,8	1,3	97	1,7	
Ser	5,46	0,990	5	0,5	0,9	101	3,1	
Arg	4,76	1,000	5	0,6	1,1	97	1,5	
Thr	4,17	0,982	5	0,7	1,2	100	1,2	
Gly	12,0	0,993	3	0,3	0,4	105	2,5	
Ala	11,8	0,998	2	0,3	0,4	91	1,5	
Pro	8,63	1,000	2	0,3	0,6	101	3,5	
GABA	12,6	1,000	2	0,2	0,4	98	2,6	
Val	9,5	1,000	2	0,3	0,5	99	1,1	
Met	9,4	1,000	2	0,3	0,5	100	2,3	
Ile	28,3	1,000	2	0,1	0,2	98	2,0	
Leu	13,7	1,000	2	0,2	0,4	100	1,4	
Phe	72,7	1,000	2	0,1	0,2	103	2,3	
Cys	7,66	0,968	10	0,4	0,7	90	2,1	
Orn	26,9	0,987	4	0,1	0,2	99	3,0	
Lys	28,4	0,988	4	0,1	0,2	101	3,3	
His	0,88	0,992	10	3,4	5,7	100	3,5	
Tyr	4,25	0,997	2	0,7	1,2	105	5,4	
Agmatine	2,78	0,999	7	1,1	1,8	93	1,3	
Tryptamine	18,6	0,943	5	0,2	0,3	107	7,6	
β-Phenylethylamine	26,7	1,000	2	0,1	0,2	100	2,3	
Putrescine	123	1,000	2	0,1	0,2	99	3,0	
Cadaverine	68	0,999	2	0,1	0,2	103	1,9	
Histamine	2,45	1,000	8	1,2	2,0	100	3,1	
Serotonine	5,28			0,6	0,9	103	6,5	
Tyramine	12,6	1,000	2	0,2	0,4	101	4,8	
Spermidine	68,3	1,000	2	0,1	0,2	99	2,5	
Spermine	71,4	0,988	2	0,1	0,2	98	1,0	
LATTE Analita								
Tau	7,35	1,000	2	0,4	0,7	99	0,7	

### **Contenuto di taurina nel latte di capra**

I risultati relativi all'evoluzione nel corso della lattazione del contenuto in taurina, della produzione, della composizione in grasso, proteine e lattosio del latte prodotto nei due allevamenti sono riportati nella tabella 8.

Gli allevamenti presso i quali è stata effettuata la ricerca mostrano differenze nel management degli animali, particolarmente per quanto attiene l'alimentazione, che si riflettono sulle caratteristiche qualitative e quantitative delle produzioni di latte. Infatti la produzione media per entrambe le razze rilevata nell'allevamento A è più elevata rispetto a quella dell'allevamento B.

In entrambi gli allevamenti si riscontrano valori di produzione più elevati negli animali di razza Maltese ( $1719 \pm 586$  e  $1044 \pm 437$  g/d per gli animali dell'allevamento A e B rispettivamente) rispetto a quelli di razza Sarda ( $1172 \pm 358$  e  $731 \pm 375$  g/d per gli animali dell'allevamento A e B rispettivamente).

Queste differenze si rivelano significative al Tukey's test. Significative risultano essere anche le differenze nel contenuto medio di grasso: rispetto ai campioni di razza Maltese, quelli di razza Sarda risultano avere per questo parametro valori più elevati e tra questi, i campioni dell'allevamento B ( $5,86 \pm 1,02$  g/100ml) presentano contenuto medio di grasso maggiore rispetto a quelli dell'allevamento A ( $5,50 \pm 1,29$  g/100ml). Stessa situazione si rileva anche per il contenuto medio di proteine e lattosio, anche se le differenze non risultano significative al Tukey's test. Relativamente al contenuto medio in cellule somatiche ( espresse come Log CCS/ml), gli animali dell'allevamento A presentano differenze significative in relazione alla razza, in particolare quelli di razza Sarda presentano valori medi più



bassi ( $2,47 \pm 0,32$ ), mentre quelli di razza Maltese valori più elevati ( $2,889 \pm 0,51$ ) rispetto a quelli dell'allevamento B nel quale non si riscontrano differenze significative tra le due razze ( $2,75 \pm 0,49$  per la razza Maltese e  $2,72 \pm 0,451$  per la razza sarda). Per quanto riguarda i quantitativi medi di taurina, i campioni dell'allevamento A risultano avere contenuto maggiore rispetto a quelli dell'allevamento B. Le differenze più significative si riscontrano tra i campioni di razza Sarda, infatti quelli dell'allevamento A presentano valori pari a  $17,04 \pm 5,61$  mg/100ml, mentre quelli dell'allevamento B hanno valori pari a  $9,19 \pm 5,36$  mg/100ml. Dal confronto con la letteratura (Tripaldi et al 1998) si rileva che i campioni dell'allevamento A presentano quantitativi simili a quelli medi riscontrati per capre della razza Maltese (ca. 11,3 mg/100ml), mentre il latte proveniente dall'allevamento B ha valori decisamente inferiori per capre di questa razza e sono risultati assimilabili a quelli della razza Garganica (6,9 mg/100ml).

La fase di lattazione influenza significativamente i valori dei parametri analizzati riportati in tabella 9. Il Tukey's test mette in evidenza che i campioni della prima fase di lattazione si differenziano da tutti gli altri per quantitativo medio di latte prodotto, contenuto medio di lattosio e di cellule somatiche. Come riportato in letteratura (Leitner et al. 2011), col progredire della lattazione, si assiste ad una riduzione della quantità di latte associata a modificazioni della composizione. Nella tarda lattazione è descritto un incremento del contenuto in cellule somatiche, molto marcato nella capra, del grasso e delle proteine. Si riduce invece il contenuto in lattosio. Questa situazione si riscontra normalmente in presenza di infiammazione della mammella conseguenza di una minore funzionalità del parenchima

secernente. Anche per la taurina nella prima fase di lattazione si osserva un contenuto medio più elevato ( $13,95 \pm 5,64$  mg/100ml), nonostante la differenza con le successive fasi non risulti significativa al Tukey's test.

**Tabella 8** Composizione del latte di capra prodotto nei due allevamenti nelle diverse fasi di lattazione (valori medi, massimi e minimi) e risultati del Tukey's test

	Mese di produzione	Media $\pm$ ds	Minimo	Massimo
<b>Produzione di latte (g/die)</b>	febbraio	1461 <sup>b</sup> $\pm$ 679	317	2685
	maggio	1053 <sup>a</sup> $\pm$ 459	322	2190
	giugno	999 <sup>a</sup> $\pm$ 451	327	2025
<b>Taurina (mg/100ml)</b>	febbraio	13,9 <sup>a</sup> $\pm$ 5,6	5,2	24,4
	maggio	11,7 <sup>a</sup> $\pm$ 5,6	3,8	23,4
	giugno	12,1 <sup>a</sup> $\pm$ 7,1	3,7	30,9
<b>Grasso (g/100ml)</b>	febbraio	4,73 <sup>a</sup> $\pm$ 1,14	2,39	6,58
	maggio	5,32 <sup>a</sup> $\pm$ 1,07	3,09	7,51
	giugno	5,40 <sup>a</sup> $\pm$ 1,13	3,42	8,27
<b>Proteine (g/100ml)</b>	febbraio	3,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,43	3,02	5,03
	maggio	3,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,44	2,85	4,74
	giugno	3,58 <sup>a</sup> $\pm$ 0,52	2,86	5,30
<b>Lattosio (g/100ml)</b>	febbraio	4,83 <sup>b</sup> $\pm$ 0,23	4,24	5,17
	maggio	4,65 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19	4,34	5,05
	giugno	4,57 <sup>a</sup> $\pm$ 0,23	4,11	4,94
<b>Log CCS/ml</b>	febbraio	2,42 <sup>a</sup> $\pm$ 0,32	1,91	3,09
	maggio	2,78 <sup>b</sup> $\pm$ 0,38	2,18	3,46
	giugno	2,88 <sup>b</sup> $\pm$ 0,40	2,15	3,77

<sup>a-b</sup> i valori medi all'interno della stessa colonna con differenti lettere sono significativamente differenti ( $p = 0.05$ )

**Tabella 9** Composizione del latte di capra di razza Sarda e Maltese negli allevamenti A e B nelle diverse fasi di lattazione (2: Febbraio; 4: Maggio; 5: Giugno) e risultati del Tukey's test

Allevamento	Razza	Campione	Mese di produzione	Produzione g/die	Taurina mg/100ml	Grasso g/100ml	Proteine g/100ml	Lattosio g/100ml	Log CCS/ml
A	MALTESE	1	2	2.685	10,8	3,99	3,02	4,96	2,74
		1	4	2.190	10,1	4,59	2,95	4,66	2,75
		1	5	2.025	12,0	4,99	3,06	4,80	2,70
		2	2	2.040	9,3	4,75	3,37	4,80	2,65
		2	4	1.012	4,6	5,44	3,46	4,47	3,38
		2	5	767	5,0	6,29	3,78	4,60	3,51
		3	2	2.570	11,2	4,30	3,40	4,81	2,65
		3	4	1.820	11,1	4,59	3,58	4,79	2,72
		3	5	1.365	17,8	5,12	3,65	4,53	3,08
		4	2	2.605	11,8	3,23	3,16	4,51	2,44
		4	4	1.290	13,1	3,09	2,85	4,34	2,80
		4	5	1.635	26,0	3,86	3,25	4,11	2,88
		5	2	2.045	8,8	3,35	3,20	5,16	2,68
		5	4	1.875	12,9	4,56	3,32	4,80	2,95
		5	5	1.670	15,3	4,89	3,32	4,94	2,58
		6	2	1.187	8,9	5,45	3,57	4,66	2,70
		6	4	963	5,5	4,96	3,58	4,43	3,30
		6	5	1.203	4,7	4,08	3,68	4,47	3,34
		<b>MEDIA ds</b>		<b>1719<sup>c</sup>±586</b>	<b>11,1<sup>a</sup>±5,2</b>	<b>4,53<sup>a</sup>±0,84</b>	<b>3,34<sup>a</sup>±0,27</b>	<b>4,66<sup>a</sup>±0,25</b>	<b>2,88<sup>b</sup>±0,31</b>
A	SARDA	7	2	1.815	24,4	5,29	3,84	5,06	2,15
		7	4	1.150	19,7	6,04	3,82	4,85	2,45
		7	5	1.340	30,9	6,56	4,10	4,76	2,15
		8	2	1.760	15,1	3,78	3,07	4,88	2,74
		8	4	1.525	8,5	4,65	3,44	4,94	2,78
		8	5	1.565	12,7	4,69	3,61	4,90	2,95
		9	2	1.345	22,7	4,34	3,08	4,61	2,62
		9	4	1.325	18,6	4,11	3,20	4,64	3,08
		9	5	1.340	10,9	3,42	2,99	4,47	2,89
		10	2	1.096	14,5	6,58	5,03	4,24	1,93
		10	4	861	20,1	7,51	4,74	4,44	2,33
		10	5	655	9,6	8,27	5,30	4,22	2,56
		11	2	860	16,9	4,98	3,59	4,78	2,23
		11	4	988	17,1	5,12	3,63	4,80	2,18
		11	5	1.160	14,1	5,57	3,79	4,76	2,49
		12	2	830	20,5	5,39	3,07	5,07	2,23
		12	4	607	18,0	6,59	3,20	4,94	2,32
		12	5	870	12,5	6,15	3,48	4,94	2,34
		<b>MEDIA ds</b>		<b>1172<sup>b</sup>±358</b>	<b>17,0<sup>b</sup>±5,6</b>	<b>5,50<sup>bc</sup>±1,29</b>	<b>3,72<sup>a</sup>±0,68</b>	<b>4,74<sup>a</sup>±0,25</b>	<b>2,47<sup>a</sup>±0,32</b>

13	2	1.565	12,7	2,72	3,38	4,84	2,40
13	4	1.150	13,6	3,94	3,38	4,51	2,55
13	5	918	15,4	4,92	3,34	4,32	2,53
14	2	1.940	10,1	4,85	3,67	4,95	2,44
14	4	721	6,0	5,29	3,30	4,45	3,46
14	5	620	6,8	4,73	3,51	4,36	3,10
15	2	1.950	23,4	3,69	3,23	5,05	2,01
15	4	1.143	8,0	4,65	3,04	4,56	2,90
15	5	918	6,1	3,90	2,86	4,35	3,27
16	2	866	13,9	5,76	3,46	4,86	1,91
16	4	872	13,7	5,29	3,31	4,58	2,31
16	5	628	16,6	5,47	3,11	4,48	2,65
17	2	780	22,5	4,78	3,62	4,39	3,09
17	4	740	8,6	4,83	3,35	4,54	3,44
17	5	846	21,3	4,79	3,41	4,37	3,16
<b>MEDIA ds</b>		<b>1044<sup>ab</sup>±437</b>	<b>13,2<sup>ab</sup>±5,8</b>	<b>4,64<sup>ab</sup>±0,78</b>	<b>3,33<sup>a</sup>±0,21</b>	<b>4,57<sup>a</sup>±0,24</b>	<b>2,75<sup>ab</sup>±0,49</b>
18	2	950	14,2	2,39	3,48	5,16	2,08
18	4	985	3,8	6,00	3,48	4,62	2,69
18	5	746	3,7	5,71	3,33	4,63	3,06
19	2	575	5,2	5,81	3,84	4,84	2,76
19	4	475	7,6	6,55	4,27	4,49	2,69
19	5	452	6,4	5,67	4,11	4,63	2,76
20	2	317	7,7	6,34	4,19	4,83	2,56
20	4	322	23,4	5,40	4,41	4,70	2,78
20	5	327	13,7	5,76	4,42	4,77	3,77
21	2	786	5,8	5,82	3,38	4,78	2,35
21	4	596	5,6	6,31	3,41	4,93	2,33
21	5	387	4,2	6,57	3,52	4,71	2,39
22	2	1.795	16,1	5,80	3,40	5,17	1,92
22	4	904	13,0	7,26	3,43	5,05	2,61
22	5	673	7,5	7,23	3,39	4,81	2,97
23	2	1.255	14,3	5,46	3,50	4,78	2,58
23	4	720	7,0	5,80	3,36	4,48	3,28
23	5	888	6,2	5,64	3,38	4,30	3,31
<b>MEDIA ds</b>		<b>731<sup>a</sup>±375</b>	<b>9,2<sup>a</sup>±5,4</b>	<b>5,86<sup>c</sup>±1,02</b>	<b>3,68<sup>a</sup>±0,40</b>	<b>4,76<sup>a</sup>±0,23</b>	<b>2,72<sup>ab</sup>±0,45</b>

I risultati della correlazione di Pearson riportati in tabella 10 confermano quanto riportato per la capra da Leitner (2011), infatti viene evidenziata la correlazione negativa significativa tra LogCCS/ml ed i parametri contenuto di lattosio, produzione di latte. Nel nostro caso si rileva per questo parametro una correlazione negativa anche con la taurina. All'aumentare del contenuto in cellule somatiche si assiste anche ad una diminuzione del contenuto in grasso e proteine che però non risulta essere significativa.

**Tabella 10: Coefficienti di correlazione di Pearson tra i parametri determinati in campioni di latte di capra di razza Sarda e Maltese negli allevamenti A e B**

	<b>Produzione</b>	<b>Taurina</b>	<b>Grasso</b>	<b>Proteine</b>	<b>Lattosio</b>	<b>LogCCS/ ml</b>
<b>Produzione</b>	1	,176	-,546(**)	-,382(**)	,285(*)	-,276(*)
<b>Taurina</b>	,176	1	-,097	,083	,110	-,292(*)
<b>Grasso</b>	-,546(**)	-,097	1	,601(**)	-,052	-,097
<b>Proteine</b>	-,382(**)	,083	,601(**)	1	-,170	-,120
<b>Lattosio</b>	,285(*)	,110	-,052	-,170	1	-,317(**)
<b>LogCCS/ml</b>	-,186	-,403(**)	-,097	-,120	-,464(**)	1
<b>Numero di campioni</b>	69	69	69	69	69	69

\*\* La correlazione è significativa al livello 0,01.

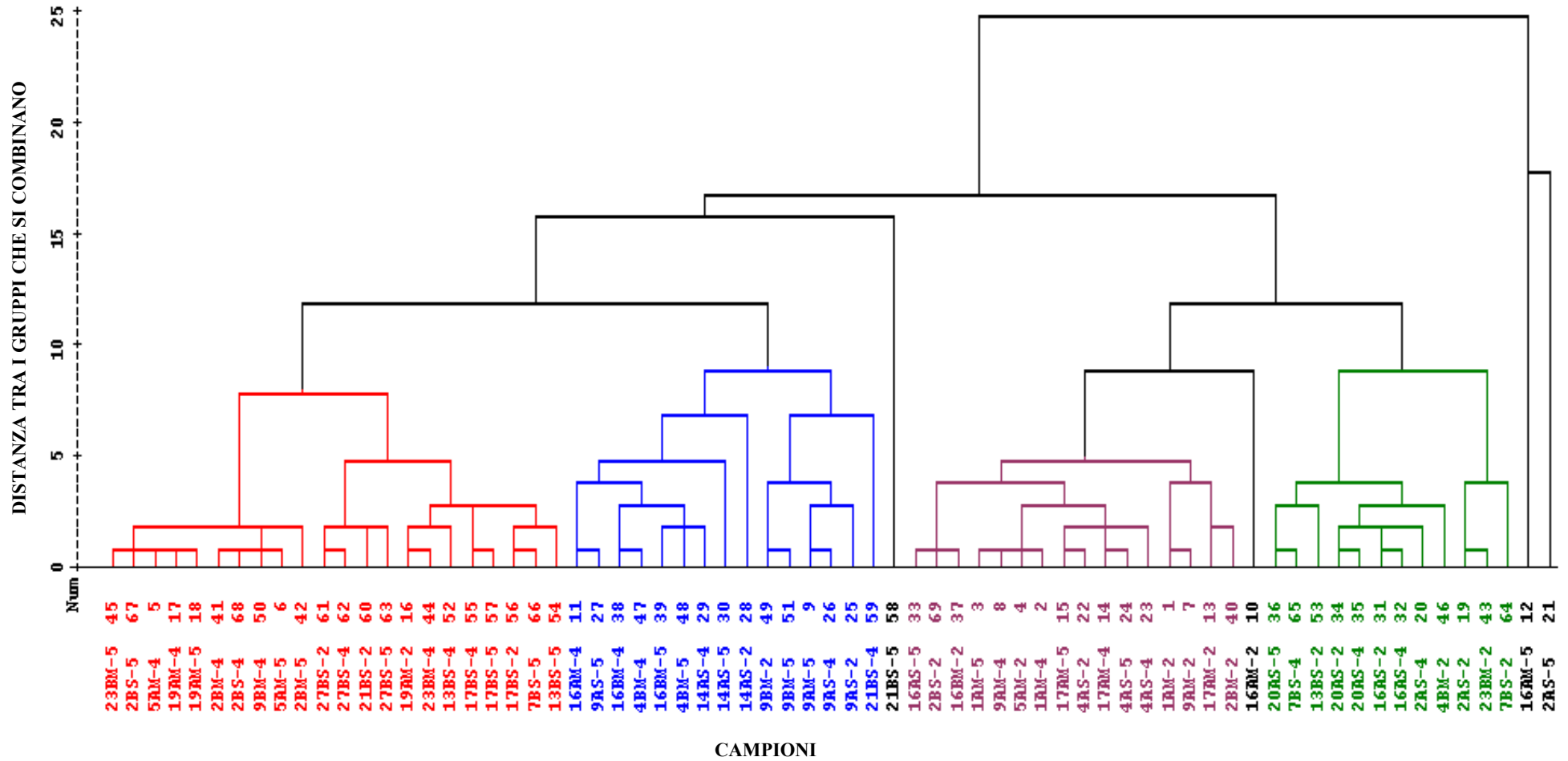
\* La correlazione è significativa al livello 0,05.

Considerata la grande variabilità riscontrata per i parametri considerati sia in base alla razza all'allevamento di produzione che alla fase di lattazione, si è proceduto a valutare tramite la Hierarchical Cluster Analysis (HCA) l'esistenza di gruppi tra i campioni considerati. Al set dati composto da 69 oggetti e 4 variabili (LogCCS/ml, produzione di latte, contenuto di lattosio e di taurina) è stata applicata l'analisi statistica multivariata HCA (Figura 11).

Nel dendrogramma è possibile mettere in evidenza 4 gruppi: il primo costituito da 22 campioni il secondo da 15 il terzo da 17 e il 4 da 12. Gli oggetti N° 58, 10, 12 e 21 risultano essere dei *singleton*. Nella tabella 11 si riportano i valori medi di Log CCS/ml, lattosio, produzione di latte e taurina riscontrata nei 4 gruppi individuati tramite l'analisi HCA.

Il 1° gruppo è costituito da campioni con elevato valore medio di Log CCS/ml, a cui corrispondono valori medi di produzione di latte, contenuto in lattosio e in taurina bassi, confermando la relazione esistente tra alto contenuto in cellule somatiche e bassa qualità del latte. Rispetto a quelli del 1° gruppo i campioni del 2° gruppo presentano più bassi valori medi di Log CCS/ml a cui corrispondono valori di produzione del latte leggermente più elevati; piuttosto anomalo è l'elevato contenuto di taurina che risulta essere simile a quello dei gruppi 3° e 4° che in assoluto sono quelli con più elevati valori medi di produzione di latte e di lattosio in accordo con il basso contenuto di cellule somatiche (più marcato nei campioni del 4° gruppo)

**Fig 11. Dendrogramma ottenuto mediante HCA del data set composto da 69 campioni e 4 variabili**



**Tabella 11 Differenze nei valori medi della composizione del latte di capra appartenenti ai 4 gruppi di campioni individuati dal cluster analysis**

		<b>N° Gruppi</b>	<b>N° Campioni gruppo</b>	<b>Media ± ds</b>	<b>Minimo</b>	<b>Massimo</b>
<b>Produzione di latte (g/die)</b>	1	22		767,00 <sup>a</sup> ± 251,19	317	1203
	2	15		986,20 <sup>ab</sup> ± 318,26	322	1365
	3	17		1899,71 <sup>c</sup> ± 441,04	1160	2685
	4	12		1132,08 <sup>b</sup> ± 453,42	607	1950
<b>Taurina (mg/100ml)</b>	1	22		6,1 <sup>a</sup> ± 1,5	3,7	8,9
	2	15		16,9 <sup>c</sup> ± 4,4	9,6	23,4
	3	17		11,8 <sup>b</sup> ± 2,1	8,5	15,3
	4	12		17,4 <sup>c</sup> ± 3,9	12,5	24,4
<b>Grasso (g/100ml)</b>	1	22		5,59 <sup>b</sup> ± 0,82	3,90	7,23
	2	15		5,13 <sup>ab</sup> ± 1,42	3,09	8,27
	3	17		4,40 <sup>a</sup> ± 0,77	2,72	5,57
	4	12		5,37 <sup>ab</sup> ± 1,29	2,39	7,26
<b>Proteine (g/100ml)</b>	1	22		3,53 <sup>a</sup> ± 0,34	2,86	4,27
	2	15		3,69 <sup>a</sup> ± 0,78	2,85	5,30
	3	17		3,34 <sup>a</sup> ± 0,24	2,95	3,79
	4	12		3,46 <sup>a</sup> ± 0,23	3,07	3,84
<b>Lattosio (g/100ml)</b>	1	22		4,58 <sup>a</sup> ± 0,17	4,30	4,93
	2	15		4,45 <sup>a</sup> ± 0,14	4,22	4,70
	3	17		4,84 <sup>b</sup> ± 0,14	4,51	5,16
	4	12		4,97 <sup>b</sup> ± 0,13	4,78	5,17
<b>LogCCS/ml</b>	1	22		2,97 <sup>c</sup> ± 0,38	2,33	3,51
	2	15		2,69 <sup>b</sup> ± 0,34	1,93	3,16
	3	17		2,66 <sup>b</sup> ± 0,16	2,40	2,95
	4	12		2,20 <sup>a</sup> ± 0,20	1,91	3,51



### **Contenuto di acido $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) e amminoacidi liberi totali nei formaggi ovini.**

I risultati relativi al contenuto di GABA e di amminoacidi liberi totali (AL Tot) nei campioni di formaggi analizzati, sono riportati nella tabella 12.

La tipologia di formaggi con il più elevato livello di GABA è il Casu Marzu i cui valori variano da 34,4 a 1.001,3 mg 100 g<sup>-1</sup> e il Pecorino stagionato del pastore (0,0-378,1 mg 100 g<sup>-1</sup>), mentre i campioni di Pecorino Sardo DOP presentano un contenuto inferiore (valori compresi tra 2,3 e 52,0 mg 100 g<sup>-1</sup>).

Dal confronto con la letteratura è possibile notare che rispetto ad altri formaggi ovini tipici italiani i prodotti sardi presentano contenuti generalmente più elevati. Infatti la maggior parte dei campioni di Casu Marzu e Pecorino presentano un contenuto di GABA da 2 a 10 volte superiore al livello massimo riportato in letteratura che risulta di 39,1 mg 100 g<sup>-1</sup> (Siragusa et al. 2007). In particolare tre campioni di Casu Marzu presentano un contenuto fino a 20 volte superiore a quello riscontrato da Siragusa (2007).

I risultati mostrano una elevata variabilità nel contenuto di GABA non solo tra i tre tipi diversi di formaggio considerati, ma anche tra quelli della stessa tipologia. Tali differenze sono correlate al diverso grado di proteolisi osservato tra i diversi formaggi. Infatti considerato che il contenuto di amminoacidi liberi totali è un indice del livello di proteolisi, si riscontra una correlazione positiva tra questo parametro ed il contenuto di GABA (coefficiente di Pearson = 0,552 ad un livello  $p = 0,01$ ).

Come per il GABA i livelli di amminoacidi totali più elevati si riscontrano nei campioni di Casu Marzu. Questo è probabilmente dovuto all'elevata attività proteolitica indotta dalle larve *Piophilidae*, ed alla temperatura elevata alla quale avviene la maturazione del formaggio (Mazzette et al., 2011). I campioni di Pecorino del pastore tendono ad avere un contenuto totale di amminoacidi liberi superiori a quelli di Pecorino Sardo DOP prodotti in caseifici. Come riportato in letteratura, tali differenze possono essere attribuite a variazioni nei processi produttivi (Pintado et al., 2008, Schirone et al., 2011) adottati dai diversi produttori.

Grande variabilità nel contenuto di amminoacidi liberi totali si è inoltre osservata all'interno dello stesso tipo di formaggio in campioni con lo stesso grado di maturazione, confermando che i processi produttivi possono variare da un produttore all'altro, come spesso può accadere per i prodotti artigianali. Nel Pecorino Sardo DOP, come riportato in letteratura (Manca et al., 1999), la variabilità nel contenuto amminoacidi liberi totali è dovuto a un protocollo di produzione poco rigoroso. Considerando il profilo amminoacidico (% di ciascun composto sul totale degli amminoacidi liberi) mostrato nella tabella 13, si evidenzia che in 3 campioni di Pecorino stagionato e in 3 di Casu Marzu, il GABA è l'amminoacido maggiormente rappresentato rispetto al totale degli amminoacidi liberi (variabili rispettivamente da 12,3 a 18,5% e da 14,2 a 22,9%), una situazione mai riscontrata in formaggi ovini. In quasi tutti gli altri campioni, compresi anche quelli di Pecorino Sardo, è l'acido glutammico, amminoacido precursore del GABA, che risulta predominante, seguito da leucina, valina e lisina: questo profilo è molto simile a quello riscontrato in altri formaggi ovini (Izco et al., 2000; Barcina et al., 1995).

### **Contenuto di ammine biogene nei formaggi ovini.**

Come per il contenuto in GABA e in aminoacidi liberi totali anche per il contenuto totale di ammine biogene (ABTot) si è riscontrata un'elevata variabilità tra i formaggi di diverse tipologie ma anche all'interno della stessa tipologia.

Come mostrato in tabella 12, il Casu Marzu è risultata la tipologia con il più alto contenuto di ammine biogene totali; in particolare, due campioni presentano valori di 1035,7 e 923,0 mg/100g<sup>-1</sup> rispettivamente. Gli altri campioni di Casu Marzu hanno valori compresi 62,9-282,1 mg 100g<sup>-1</sup>, più simile a quello trovato in altri formaggi italiani artigianali come il Formaggio di Fossa (Mascaro et al., 2010) e Pecorino di Farindola (Schirone et al., 2011). Considerando i valori soglia di 75-90 mg/100g<sup>-1</sup> proposti per le ammine biogene totali negli alimenti (Spanjer & Van Roode, 1991, ten Brink et al., 1990), il Casu Marzu può essere considerato pericoloso, soprattutto per i pazienti trattati con farmaci inibitori delle monoaminossidasi (MAO).

Anche quattro campioni di Pecorino del pastore mostrano un contenuto di ammine biogene totali (tra 79,0 e 287,8 mg 100g<sup>-1</sup>) che superano la soglia proposta, mentre gli altri campioni presentano valori compresi tra 9,4 e 73,4 mg 100g<sup>-1</sup> che non rappresentano un rischio per la salute dei consumatori. In generale, i campioni di Pecorino del pastore hanno un maggiore livello di ammine biogene totali rispetto a quelli del Pecorino Sardo DOP i cui valori variano tra 3,1 e 33,5 mg 100g<sup>-1</sup>.

Considerato che le ammine biogene sono considerate un indice di cattive condizioni igieniche, l'elevato contenuto di questi composti riscontrati in Casu Marzu e Pecorino del pastore potrebbe essere correlato a condizioni

ambientali non ottimali durante il processo di produzione (Mazzette et al., 2010). L'uso di latte crudo e di elevate temperature nei locali di stagionatura nel Pecorino del pastore e nel Casu Marzu, oltrechè di insetti in quest'ultimo, sembra favorire la produzione di ammine biogene, come già evidenziato in altri formaggi di pecora artigianali (Loizzo et al. 2013, Mascaro et al ., 2010).

Al contrario, nel Pecorino Sardo DOP, dove il latte utilizzato viene termizzato e le condizioni di temperatura e umidità nei locali di stagionatura sono sotto controllo, i prodotti hanno mostrato un basso contenuto di ammine biogene totali. La variabilità osservata nel contenuto di ammine biogene (Tabella 12), come osservato in altri tipi di formaggi (Novella-Rodriguez et al., 2003; Pintado et al., 2008) potrebbe essere attribuibile a differenze nel processo di fabbricazione. Considerando il totale degli amminoacidi e quello delle ammine biogene il test di Pearson ha evidenziato una correlazione positiva ( $p = 0.1$ ) tra le due variabili (coefficiente di Pearson = 0,503), confermando i risultati di Giraffa (1995), che ha osservato un aumento di ammine biogene corrispondenti ad un aumento della proteolisi. Tra le ammine determinate, agmatina e serotonina non sono mai state trovate, mentre tiramina, cadaverina e putrescina risultano le principali ammine in tutti i tipi di formaggio considerato, anche se il loro contenuto varia in larga misura. Nel Casu Marzu i più alti livelli trovati per tiramina, cadaverina e putrescina sono 231,4, 470,7 e 165,8 mg  $100g^{-1}$ , rispettivamente.

Dal confronto con la letteratura (Loizzo et al., 2013), alcuni campioni di Casu Marzu sembrano presentare i più alti contenuti di ammine biogene trovati nei formaggi fino ad ora. In Blu Cheese, uno dei più ricchi in

ammine biogene (Loizzo et al., 2013, Novella-Rodriguez et al., 2003), i più alti livelli di tiramina, cadaverina e putrescina sono 158,5, 210,4 e 25,7 mg 100g<sup>-1</sup>, rispettivamente. Indipendentemente dal tipo di formaggio, istamina, triptamine e  $\beta$ -feniletilammina sono presenti solo in circa il 50% dei campioni e anche per queste ammine le concentrazioni più elevate si trovano nei campioni di Casu Marzu e Pecorino. Le poliammine spermidina e spermina risultano presenti solo in Pecorino Sardo DOP, con un contenuto che varia da 0,0-11,1 e 0,0-5,4 mg 100 g<sup>-1</sup> rispettivamente, molto simile a quello trovato in Blu cheese (Novella-Rodriguez et al., 2003).

Tramite il test di Pearson si è evidenziato che esiste una correlazione significativa (livello  $p = 0,01$ ) tra GABA e le ammine putrescina, cadaverina e triptamine (coefficienti di correlazione di Pearson rispettivamente 0,797, 0,780 e 0,765). Pertanto, si può ritenere che i fattori responsabili della produzione di ammine biogene, quali la temperatura, il pH, la disponibilità di aminoacidi liberi e, soprattutto, microrganismi con attività decarbossilasica degli aminoacidi (Pinho et al., 2001) possano anche influenzare la sintesi di GABA (Siragusa et al., 2007, Dhakal, Bajpai e Baek, 2012).

D'Altronde in letteratura è stato riportato che in formaggi e altri prodotti caseari alcune specie microbiche responsabili della sintesi di una o più ammine biogene sono anche coinvolte nella produzione di GABA. In particolare, i generi *Lactobacilli* comprendono diversi ceppi delle specie *Lb. paracasei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, e *Lactococcus lactis*, attivi nella produzione di GABA ( Siragusa et al, 2007), ma anche nella produzione di una o più ammine biogene (Linares et al., 2012, Galgano et

al., 2001); ad esempio un ceppo di *Streptococcus thermophilus* può formare sia GABA che tiramina e istamina (Maifreni et al., 2013), mentre cadaverina, putrescina e istamina ma anche GABA potrebbero essere prodotti da specie appartenenti ai generi *Enterococcus* (Dhakal et al., 2012).

Molte di queste specie di batteri, in particolare *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. paracasei*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus* sono componenti della microflora del formaggio tradizionale Pecorino Sardo (Mannu et al., 2002, Madrau et al., 2006). Pertanto le tipologie di formaggi ovini considerate, sembrano presentare le condizioni ideali per favorire la produzione e l'accumulo sia di GABA che ammine biogene.

**Tabella 12: Contenuto di GABA, amminoacidi liberi totali, e ammine biogene in formaggi ovisi prodotti in Sardegna (mg 100g<sup>-1</sup>).**

Tipologia	Giorni di maturazione	GABA	AL Tot *	Tryptamina	β-phenyl-ethylamina	Putrescina	Cadaverina	Istamina	Tyramina	Spermidina	Spermina	AB Tot **	
<b>Pecorino Sardo DOP</b>	30	2,5	281,3	1,6	nd	0,1	1,3	nd	1,6	1	1	6,5	
	30	2,3	334,7	nd	nd	0,1	1,4	0,8	3,5	nd	4	9,8	
	60	4,5	822,9	9,3	nd	1,1	1,4	nd	19,3	0,6	2	33,5	
	60	3,7	815	5,7	nd	0,1	1,4	0,5	3,5	2,9	0	14,4	
	60	4,2	768,7	2,1	nd	0,1	9,7	7,2	3,5	1,1	0	24,2	
	60	3,6	794,6	1,4	nd	1,1	1,7	0,7	nd	nd	5	20,2	
	90	8,8	1473	2,4	nd	0,7	0,9	2,7	4,4	7,2	1	19,2	
	150	2,7	1616	3,2	nd	0,1	3,6	2,1	7,9	3,4	1	21,3	
	150	13,7	578,7	nd	nd	nd	0,1	nd	1,4	2,7	0	4,4	
	180	2,8	588,1	1,7	nd	0,5	0,3	3,3	1	0,4	0	7,4	
	180	6,1	934,4	nd	nd	0,1	1,3	0,6	0,4	0,6	0	3,1	
	270	52	1387	nd	nd	nd	0,7	4,3	6,4	11	1	23,6	
	360	10,2	1893	nd	nd	0,8	2,6	5,3	16,3	0,5	2	27,8	
	<b>Pecorino</b>	60	71,3	619,3	nd	0,9	3,4	15,4	nd	5,7	nd	nd	25,5
60		20,6	840,8	2,9	2,1	1,1	5,3	nd	4,7	nd	nd	16,1	
90		228,4	1438	nd	nd	2,7	11	nd	30,8	nd	nd	44,5	
90		378,1	2047	4,1	8,6	92,7	137	24,4	21	nd	nd	287,8	
150		nd	1242	nd	nd	nd	nd	nd	13,2	nd	nd	13,2	
150		11,6	1481	nd	nd	16,4	5,5	nd	37,3	nd	nd	59,2	
180		20,5	3267	nd	5,4	nd	4,8	nd	68,6	nd	nd	73,4	
180		135,4	5402	11	4,7	13	1,7	128	93	nd	nd	247,2	
180		9,8	411,1	nd	nd	nd	21,3	19,5	1,6	nd	nd	42,4	
270		133,3	1974	nd	nd	nd	5,2	nd	4,2	nd	nd	9,4	
360		339	2754	5,4	3	33,6	33,2	33,4	17,8	nd	nd	126,4	
360		75,3	5269	14	7,1	5,1	33,6	nd	19,7	nd	nd	79	
<b>Casu Marzu</b>		60	51,3	2393	nd	4,9	4,1	28,8	nd	3nd	nd	nd	62,9
		60	203,5	1947	5,1	nd	1,9	3,1	nd	61	nd	nd	71,1
	90	122,5	4020	nd	10,8	67,8	8,8	nd	150	nd	nd	226,7	
	90	63,2	4345	16	16,2	90,6	8	nd	168	nd	nd	282,1	
	90	1001	7052	16	13,2	58,2	69,6	nd	93,7	nd	nd	237,3	
	90	66,4	6320	12	10,8	39,1	6,3	nd	187	nd	nd	244,7	
	90	959,8	4197	33	90,9	140	462	99,3	188	nd	nd	923	
	90	34,4	2536	nd	nd	8,3	24,7	35,6	47,1	nd	nd	115,7	
	90	806,2	3706	42	nd	166	471	126	231	nd	nd	1036	

\* Amminoacidi Liberi Totali

\*\* Ammine Biogene Totali

nd: non determinabili

**Tabella 13: profilo amminoacidico in differenti tipologie di formaggi prodotti in Sardegna (percentuale AL Tot per ogni amminoacido)**

Tipologia	Giorni di maturazione	Asp	Glu	Ser	Thr	Gly	Ala	Arg	Pro	GABA	Val	Met	Ile	Leu	Phe	Orn	Cys	Lys	His	Tyr
<b>Pecorino Sardo DOP</b>	30	2,1	8,4	1,7	0,4	1,2	5,6	21,3	6,5	0,9	9,5	5,0	3,8	10,1	8,8	1,3	0,1	9,3	0,9	3,1
	30	0,2	18,9	3,2	0,5	1,3	9,7	9,2	5,0	0,7	10,0	3,3	3,0	10,2	7,9	1,5	0,1	9,7	1,6	4,3
	60	2,0	18,9	1,1	0,1	0,7	9,8	6,1	2,9	0,5	10,8	1,7	1,9	17,1	10,5	1,2	0,0	5,7	5,8	3,1
	60	1,1	16,5	2,1	2,9	1,6	6,0	6,8	7,3	0,5	9,6	4,0	4,1	11,9	7,6	1,7	0,0	11,8	2,3	2,2
	60	3,9	22,1	2,4	2,9	1,1	4,6	1,7	8,2	0,5	9,7	3,7	4,3	12,2	6,9	2,2	0,1	8,0	2,6	2,7
	60	6,2	22,4	1,8	0,6	0,7	6,0	7,7	4,1	0,5	9,5	3,6	2,6	10,9	7,6	1,6	0,1	9,3	1,6	3,3
	90	4,9	18,4	3,1	3,5	1,5	4,2	0,0	8,6	0,6	8,4	3,7	5,1	10,2	6,5	1,9	0,0	13,2	4,0	2,2
	150	6,9	21,0	0,0	1,1	0,7	5,1	7,2	5,6	0,2	8,6	3,4	4,0	10,7	6,3	1,5	0,0	12,0	3,1	2,5
	150	2,0	5,4	1,6	1,1	1,5	4,9	5,7	6,7	2,4	14,2	5,3	3,9	14,9	12,1	1,5	0,0	11,8	1,7	3,2
	180	2,6	17,2	3,1	2,2	1,6	4,1	0,1	8,5	0,5	8,9	3,8	6,3	10,7	6,6	2,0	0,1	14,5	4,0	3,1
	180	7,3	25,5	4,3	2,5	1,6	4,4	0,0	7,3	0,7	6,4	2,5	5,6	7,6	4,3	3,4	0,1	10,4	4,0	2,1
270	7,0	2,1	1,9	0,4	0,6	1,6	10,4	12,1	3,7	11,6	4,2	7,5	13,2	7,4	1,3	0,0	9,5	0,1	5,2	
360	6,4	9,1	2,4	3,5	1,8	4,9	5,2	9,6	0,5	8,3	4,0	0,7	11,1	6,4	3,1	2,9	14,1	5,0	1,0	
<b>Pecorino</b>	60	9,2	9,0	0,0	1,9	0,0	5,9	1,9	3,7	11,5	12,3	5,6	5,7	13,3	7,7	3,3	0,0	9,2	0,0	0,0
	60	7,1	27,5	0,0	2,2	0,0	4,3	2,3	4,3	2,5	9,9	5,2	6,5	12,3	0,0	3,9	2,4	9,6	0,0	0,0
	90	4,8	2,0	3,8	3,2	1,7	5,4	0,0	6,0	15,9	9,4	4,8	6,3	13,2	7,7	1,1	0,0	12,4	0,0	0,0
	90	0,9	1,9	0,0	3,4	0,0	10,2	2,4	9,1	18,5	13,1	5,5	9,1	16,6	5,5	1,1	0,0	2,8	0,0	0,0
	150	0,0	20,3	0,0	0,0	0,9	4,1	0,0	4,2	0,0	13,4	3,8	3,0	18,0	10,8	6,0	0,0	10,6	0,0	3,2
	150	9,6	24,8	0,0	1,2	1,1	2,6	0,0	3,1	0,8	10,5	2,9	4,0	16,8	8,4	1,1	0,0	9,1	0,0	1,8
	180	4,1	17,9	3,6	2,5	1,9	3,9	0,0	7,7	0,6	9,2	2,9	6,5	11,1	6,3	4,7	0,0	11,7	3,0	0,9
	180	5,7	16,8	0,0	2,2	2,1	4,2	0,0	11,8	2,5	8,7	3,3	6,5	10,2	5,5	5,1	0,0	12,5	0,0	1,0
	180	0,6	25,6	0,0	0,8	0,0	7,0	1,2	7,1	2,4	14,6	3,9	7,9	16,8	0,0	2,1	0,0	10,1	0,0	0,0
	270	3,9	21,0	1,7	2,4	0,0	5,0	3,4	6,0	6,8	9,5	4,2	6,7	11,7	4,1	3,9	0,0	9,8	0,0	0,0
	360	5,1	12,5	2,4	5,9	0,0	4,3	2,4	10,9	12,3	9,6	2,6	9,0	9,0	0,0	0,5	3,5	10,0	0,0	0,0
360	5,9	23,7	1,5	3,8	0,0	4,3	3,3	7,8	1,4	9,4	4,2	7,8	9,3	3,8	1,9	0,0	10,1	1,7	0,0	
<b>Casu Marzu</b>	60	4,7	14,1	1,0	2,2	0,6	6,0	0,0	3,0	2,1	8,0	5,0	6,7	12,0	6,7	4,2	0,0	13,0	4,2	3,0
	60	1,9	6,6	2,2	2,1	1,3	6,0	0,0	6,5	10,5	10,1	4,4	5,6	16,8	8,2	4,1	0,0	9,6	0,0	2,1
	90	2,7	15,4	0,0	2,8	0,8	5,3	0,0	9,4	3,0	8,6	4,4	5,9	11,3	6,9	1,8	0,0	13,5	3,2	1,2
	90	1,9	13,0	1,0	1,9	1,1	5,0	0,0	9,0	1,5	9,5	4,5	6,3	11,9	6,0	2,5	0,0	16,0	2,3	1,8
	90	2,3	9,0	1,1	1,1	3,7	4,5	0,0	11,8	14,2	9,7	2,8	6,7	10,8	5,9	0,6	0,0	10,4	1,5	1,4
	90	3,6	14,6	2,9	3,2	1,7	4,0	0,0	10,7	1,1	8,1	4,0	6,3	11,9	6,8	2,6	0,0	12,6	2,5	1,4
	90	0,0	2,2	0,9	1,7	2,1	12,1	0,0	8,7	22,9	10,8	4,1	8,4	15,7	5,1	0,5	0,0	2,5	0,0	0,0
	90	3,7	14,5	1,7	1,9	0,7	5,3	0,0	3,4	1,4	5,8	5,0	5,0	12,8	6,2	4,1	0,0	10,5	5,3	3,9
	90	0,0	1,4	0,5	1,4	1,9	11,9	0,0	6,8	21,8	10,3	5,0	8,9	18,1	5,9	0,2	0,0	0,6	0,0	0,0



## **CONCLUSIONI**

Lo studio condotto sul latte di capra di razza Sarda e Maltese proveniente da due allevamenti con diverso regime alimentare, ha evidenziato che il contenuto in taurina così come le caratteristiche quantitative e qualitative della produzione del latte, sono influenzate dalla razza, dall'alimentazione impartita alle lattifere, dallo stadio di lattazione e dallo stato sanitario degli animali. In generale gli animali di razza Maltese di entrambi gli allevamenti presentano, valori medi di produzione di latte più elevati rispetto a quelli di razza Sarda che hanno al contrario valori medi di grasso e proteine più elevati. Lo stato sanitario degli animali, valutato sulla base del valore medio del Log CCS/ml risulta migliore per gli animali dell'allevamento A che presentano, indipendentemente dalla razza, valori medi di produzione di latte giornaliera e di contenuto in lattosio superiore a quelli dell'allevamento B. Più elevati per gli animali dell'allevamento A sono anche i valori medi di taurina, confermando che anche il contenuto di questo composto dipende dallo stato sanitario dell'animale e dal regime alimentare. Anche l'analisi statistica multivariata cluster gerarchica ha messo in evidenza la presenza nel set dati di gruppi che si distinguono per il diverso contenuto di cellule somatiche, taurina, lattosio e quantitativi di produzione di latte giornaliera, in cui il contenuto di cellule somatiche è inversamente proporzionale al contenuto in taurina oltreché agli altri parametri contenuto in lattosio e produzione di latte giornaliera.

Grandi differenze sono state trovate per il GABA, amminoacidi liberi totali e il contenuto di ammine biogene nelle tre tipologie di formaggio considerati. Il Casu Marzu ed il Pecorino del pastore sono le tipologie con più alto contenuto di GABA, composto con funzioni benefiche, ma anche

di ammine biogene, in particolare tiramina, cadaverina e putrescina che in alte concentrazioni rappresentano un pericolo per la salute dei consumatori. Il test di correlazione di Pearson ha rivelato che la variabilità nel contenuto di GABA e ammine biogene è correlata con il totale degli amminoacidi liberi, indicando che la loro produzione dipende dall'intensità dei fenomeni proteolitici e quindi da fattori ambientali e produttivi che interessano tale evento biochimico. Data la correlazione significativa evidenziata dal test di Pearson (livello  $p = 0,01$ ) fra GABA e le ammine biogene più frequentemente rappresentate, si può supporre che la produzione di tutti questi composti sia influenzata dagli stessi fattori, compresa l'attività microbica. Inoltre, è stato dimostrato che i formaggi considerati, in particolare il Casu Marzu ed il Pecorino del pastore, presentano le condizioni ideali per lo sviluppo dei microrganismi con attività decarbossilasica. Considerando l'interesse dell'industria alimentare per gli alimenti funzionali, la microflora del Casu Marzu e del Pecorino del pastore può potenzialmente essere utile per arricchire di GABA formaggi o latte fermentato, ma ulteriori studi sono necessari per valutare se i ceppi microbici presenti siano in grado di produrre un elevato contenuto di GABA, ma non di ammine biogene.

## **BIBLIOGRAFIA**

Annunziata & VecchioAAVV. (2010). Report of the *General Directorate for Food, Agriculture, Fisheries and Biotechnology* of European Commission. *Functional Foods*.

Annunziata, A., e Vecchio, R. (2011). Factors affecting Italian consumer attitudes towards functional foods. *AgBioForum* 14 20-32.

Antolini F., Franciosini S., Floridi A.L., Floridi A.(1999). HPLC method for the determination of histamine, tyramine, tryptamine,  $\beta$ -phenylethylamine and their amino acid precursors in cheese for industrial purpose.

Barcina, Y., Ibáñez, F. C., Ordhiez, A. I. (1995). Evolution of free amino acids during Idiazabal cheese ripening. *Food Control*, 6, 161-164.

Barnard et al. (1998). Subtypes of gamma-amino-butyric acid receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.*, Vol 50, , pp 291-313.

Barrón-Bravo O.G., Gutiérrez-Chávez A.J., Ángel-Sahagún C.A., Montaldo H.H., Shepard L., Valencia-Posadas M. (2013). Losses in milk yield, fat and protein contents according to different levels of somatic cell count in dairy goats. *Small Ruminant Research*, 113 2–3 421-431

Bentley S., Bottarelli A., Bonardi S. -Istamina e riflessi sanitari.- *Ingegneria Alimentare*, 32-34, 5/95.

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.

Brown, R. E., Stevens, D. R., Haas H. L. (2001). The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* 63:637–672.

Cabanis J.C., “L’histamine et sa toxicité” *Bull. OIV*, 1985, 58, 656-657.

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.

Chen W., Guo J-X, Chang P. “The effect of taurine on cholesterol metabolism” *Molecular Nutrition & Food Research* 56 (2012):681–690

Cipolla, B. G., Havouis, R., & Moulinoux, J. P. (2007). Polyamine contents in current foods: A basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids*, 33, 203–212.

Cranfield, J., Spencer, H., Masakure, O. “Factors affecting the extent to which consumers incorporate functional ingredients into their diets” *Journal of Agricultural Economics* 62 (2011): 375-392.

Csapo J, Salamon S. “Composition of the mother’s milk I. Protein contents, amino acid composition, biological value. A review” *Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria* 2(2009): 174–195, Available at: <http://www.acta.sapientia.ro/acta-alim/C2-2/alim22-3.pdf>.

Dacosta. (1999). “Les amines biogènes dans les aliments” editions Yves Dacosta, Paris.

Dapkevicius M.L.N.E., Nout M.J.R., Rombouts F.M., Houben J.H., Wymenga W., 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish sludge starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 57:107-114.

Das J., Roy A., Sil P.C. “Mechanism of the protective action of taurine in toxin and drug induced organ pathophysiology and diabetic complications: a review”. *Food & Function* 3 (2012): 1251-1264.

De la Puerta C., Arrieta F.J., Balsa J.A., Botella-Carretero J.I., Zamarrón I., Vázquez

C. “Taurine and glucose metabolism” *Nutrición Hospitalaria* 25 (2010): 910-9.

De Jong, P. J., Lakke, J. P., Teelken, A. W. (1984). CSF GABA levels in Parkinson's disease. *Advances in neurology*, 40, 427–430.

Dhakal, R., Bajpai, V. K., Baek, K-H. "Production of GABA ( $\gamma$ -Aminobutyric acid) by microorganisms: a review" *Brazilian Journal of Microbiology* (2012): 1230-1241.

Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Borneo F, Fern EB, Roberfroid MB. "Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document" *British Journal of Nutrition* 81 (1999): S1-S27.

Di Tullio G. "La malattia asmatica: il ruolo della nutrizione biologica" *Suppl. al n.3, La Med. Biol.* 15-19, 2001.

Doyle M.E., Steinhart C.E., Cochran B.A., "Food Safety", 1993, Marcel Dekker, New York 254-259.

Foster, A. & Kemp, J., *Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics.*, *Current Opinion in Pharmacology* 6(1):7-17, Febbraio 2006

Franconi F., Di Leo M.A.S., Bennardini F., Ghirlanda G. "Is taurine beneficial in reducing risk factors for diabetes mellitus?" *Neurochemistry Research* 29 (2004): 143- 50.

Franconi F., Loizzo A., Ghirlanda G., Seghieri G. "Taurine supplementation and diabetes mellitus" *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 9 (2006): 32- 6.

Galgano F., Suzzi G., Favati F., Caruso M., Martuscelli M., Gardini F. Salzano G., "Biogenic amines during ripening in 'Semicotto Caprino' cheese: role of enterococci" *International Journal of Food Science and Technology* vol. 36, Issue 2, Page 153-160, Feb (2001).

Genaro M. C., Gianotti V., Marengo E., Pattono D., & Turi, R. M. (2003). A chemometric investigation of the effects of the cheesemaking process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry*, 82, 545–551.

Giles G. E., Mahoney C. R., Brunyé T. T., Gardony A. L., Taylor H. A., Kanarek R. B. “Differential cognitive effects of energy drink ingredients: Caffeine, taurine, and glucose” *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 102 (2012): 569–577.

Goycheva P, Gadjeva V, Popov P. Oxidative stress and its complications in diabetes mellitus. *Trakia J Sci* 2006;4(1):1–8.

Haber C.A., Lam T.K.T., Yu Z., Gupta N., Goh T., Bogdanovic E., Giacca A, Fantus I.G. “N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress” *The American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 285 (2003): E744-53.

Hadi H. A. R., Al Suwaidi J. A. “Endothelial dysfunction in diabetes mellitus” *Vascular Health and Risk Management* 3 (2007): 853–876.

Hagiwara, H., Seki, T., Ariga, T. “The effect of pre-germinated brown rice intake on blood glucose and PAI-1 levels in streptozotocin induced diabetic rats” *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68, (2004): 444-447.

Halasz A, Barath A, Simon-Sarkadi L, Holzhapfel W (1994). “Biogenic amines and their production by microorganisms in food”. *Trends in Food Sci. And Technol.* 5, 42-46.

Hasler, G., Van der Veen, J.W., Tumonis, T., Meyers, N., Shen, J. & Drevets, W.C. (2007) Reduced Prefrontal Glutamate/Glutamine and -Aminobutyric Acid Levels in

Hayakawa, K., Ueno, Y., Kawamura, S., Taniguchi, R., Oda, K. “Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria” *Seibutsu-Kogaku Kaishi-Journal of the Society for Fermentation and Bioengineering* 75 (1997): 239–244.

Hemme D., Bouillanne C., Metro F., Desmazeaud M.J. “Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening”. *Sciences des Aliments*, 2, 113-123, (1982).



Hertz, L., Kvamme, E., McGeer, E.G. & Schousboe, A. (1983) Glutamine, Glutamate, and Gaba in the Central Nervous System, Alan R Liss Inc., New York

Igarashi, K. And Kashiwagi, K.. Polyamines:mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* **271**:559–564, 2000.

Innocente N. & D’Agostin P. (2002). Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. *Journal Food Protection* **65**, 9, 1498-1501.

Innocente N., Stefanuto O., Piani L., Corradini C. - Primi dati per la caratterizzazione dei formaggi di malga, V Convivio: "Formaggi d'alpeggio: il pascolo, l'animale, la razza, il prodotto", Italia, Cavalese (Trento), 15 settembre 2000.

Ito T., Schaffer S.W., Azuma J. “The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications” *Amino Acids* **42** (2012): 1529-39

Izco, J., Torre, P., Barcina, Y. (2000). Ripening of Ossau-Iraty cheese: determination of free amino acids by RP-HPLC and of total free amino acids by the TNBS method. *Food Control*, **11**, 7-11.

Izquierdo I. and Medina J.H., 1991. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *TIPS* **12**, 260-265.

Jago, D. “Functional foods: market trends” Paper presented at the Functional Foods Symposium (2009), Amsterdam, The Netherlands.

Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* **2005**;4:5.

Joosten, H. M .J. (1988). The biogenic amine content of dutch cheese and their toxicological significance. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **42**, 25-42.

Kalač, P. (2009). Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine*, **7**, 65–74.

Kaneko, S., Ueda-Yamada, M., Ando, A., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Matsumura, M., et al. (2007). Cytotoxic effect of spermine on retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 455–463.

Kash SF, Tecott LH, Hodge C, Baekkeskov, S (1999) Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96: 1698-1703.

*Kerai M. D. J., Catherine J. Waterfield, S. H. Kenyon, D. S. Asker, J. A. Timbrell Taurine: Protective properties against ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation during chronic ethanol consumption in rats Amino Acids Volume 15, Numbers 1-2 / March, 1998*

Krause I., Bockhardt A., Neckermann H., Henle T., Klostermeyer H. (1995). Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 715, 67-79.

Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C., Alvarez, M. A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-10.

Loizzo, M. R., Menichini, F., Picci, N., Puoci, F., Spizzirri, U. G., Restuccia, D. (2013). Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 38-55.

Lorencová, E., Buňková, L., Matoulková, D., Dráb, V., Pleva, P., Kubáň, V., Buňka, F. (2012). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2086–2091.

L'Amoreaux W.J., Cuttitta C., Santora A., Blaize J.F., Tachjadi J., El Idrissi A. "Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines" *Journal of Biomedical Science* 17 (2010): S11, doi:10.1186/1423-0127-17-S1-S11

Lagishetty, C. V., & Naik, S. R. (2008). Polyamines: Potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. *Indian Journal of Pharmacology*, 40, 121–125.

Lanciotti R., Patrignani F., Iucci L., Guerzoni M. E., Suzzi G., Belletti N., Gardini F. (2007). Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine italian cheeses. *Food Chemistry*, 104: 693-701.

Lanza V., Pignataro A., De Michele P., Passafiume M., Locatelli C., Bufera R. “Intoxication of the month: scombroid syndrome” Educational synopses in anesthesiology and critical care medicine, Italia, the online italian journal of anesthesiology vol 1 no 3 december (1996).

Lefèvre, P. L. C., Palin, M.-F., & Murphy, B. D. (2011). Polyamines on the reproductive landscape. *Endocrine Reviews*, 32, 694–712.

Leitner G., Merin U., Silanikove N. “Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk clotting parameters: Comparison among cows, goats and sheep” *International Dairy Journal* 21 4 (2011)279-285

Lijinski W., “Significance of in vivo formation of N-nitroso compounds”, *Oncology*, 1980, 37, 223-236.

Lovaas E., “Antioxydative effects of polyamines”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1991, 68, 6, 353-358.

Mah J.H., Hwang H.J., 2009. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control* 20:796-801.

Madrau, M. A., Mangia, N. P., Murgia, M. A., Sanna, M. G., Garau, G., Leccis, L., Caredda, M., Deiana, P. (2006). Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *International Dairy Journal*, 16, 876-855.

Maifreni, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I., Innocente, N., Biasutti, M., Marino, M. (2013). Identification of the *Enterobacteriaceae* in Montasio cheese and assessment of their amino acid decarboxylase activity. *Journal of Dairy Research*, 80, 122–127.

Manca, G., Franco, M. A., Del Caro, A., Coloru, G. C. (1999). The role of the free amino acids profile in characterizing “Pecorino Sardo” cheese. *Journal of Commodity Science*, 38, 167-179.

Manca, G.; Franco, M. A.; Sanna, G.; Molinu, M. G. (2000) Determinazione mediante HPLC del contenuto di ammine biogene in prodotti lattiero-caseari della Sardegna. In: *Proceeding of XIX Congresso Nazionale di Merceologia La sfida per il terzo millennio: tecnologia, innovazione, qualità e ambiente*. Poddighe, Eds., Sassari, Italy, Vol n°3, 185-195.

Mannu, L., Riu, G., Comunian, R., Fozzi, M. C., Scintu, M. F. (2002). A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewe’s cheese: PCR-identification and evolution during ripening. *International Dairy Journal*, 12, 17-26.

Marino M., Maifreni M., Moret S., Rondinini. “The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese” Letters in Applied Microbiology 31, 169-173 (2000).

Martuscelli M., Gardini F., Torriani S., Mastrocola D., Serio A., Chaves-López C., Schirone M., Suzzi G. (2005). Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 15: 571-578.

Mascaro, N., Stocchi, R., Ricciutelli, M., Cammertoni, N., Renzi, F., Cecchini, S., Loschi, A.R., Rea, S. (2010). Contenuto di ammine biogene e caratteristiche chimico-fisiche del formaggio di Fossa. *Rivista dell’Associazione Italiana dei Veterinari Igienisti A.I.V.I.*, 8, 49-53.

Mazzette, R., Colleo, M. M., Riu, G. I, Piras, G., Piras, F., Addis, M., Pes, M., Pirisi, A., Meloni, D., Mureddu, A., Spada, S., Fiori, M., Coinu, M., Lentini, A. (2010). Produzione di "Casu Marzu" in condizioni controllate: valutazione dell'effetto della colonizzazione da *Propionispira casei* sulle

caratteristiche microbiologiche e chimiche dei formaggi. *Rivista dell'Associazione Italiana dei Veterinari Igienisti A.I.V.I.*, 7, 45-54.

Medina Miguel Ángel,\* Urdiales José Luis, Rodríguez-Caso Carlos, Francisco Javier Ramírez, And Francisca Sánchez-Jiménez Biogenic Amines and Polyamines: Similar Biochemistry for Different Physiological Missions and Biomedical Applications *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1):23–59 (2003)

Mentasti E., G. Saini, "Analisi chimica cromatografica". Piccin editore

Millan Mark J, (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology* 70: 83–244.

Mills, S., Stanton, C., Ross, R. P. "Microbial production of bioactives: from fermented functional foods to probiotic mechanisms" *The Australian Journal of Dairy Technology* 64 (2009): 41-49.

Minocha, R., Long, S. "Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid chromatography run using dansyl derivatization" *Journal of Chromatography A* 1035 (2004): 63-73.

Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2011). Polyamines in aging and disease. *Aging*, 3, 716–732.

Mollet B, Rowland I. Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 483-5.

Montedoro G. "Caratteristiche olfattive e gustative degli alimenti. Genesi dei costituenti aromatici presenti nel latte e nei formaggi". Chiriotti Editore, 216-218, (1985).

Morand-Fehr P., Fedele V., Decandia M., Le Frileux Y. "Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk" *Small Ruminant Research* 68 1–2 (2007):20-34.

Mugnaini E. & Oertel W.H. (1985). An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS revealed by GAD

immunohistochemistry. In: *Handbook of chemical neuroanatomy. GABA and neuropeptides in the CNS:Part. I.* A. Bjorklund & T. Hokflet (Eds). Elsevier, Amsterdam. Vol. 4. pp. 436-608.

Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., & Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food: existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, 75, R139eR150.

Nandhini A.T., Anuradha C.V. “Taurine modulates kallikrein activity and glucose metabolism in insulin resistant rats” *Amino Acids* 22 (2002): 27-38.

Nejati, F., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F., Gobbetti, M. (2013). Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA). *LWT - Food Science and Technology*, 51, 183-189.

Niva, M. (2007). All foods affect health: understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite*, 48: 384-393.

Novella-Rodríguez S., Veciana-Nogues M. T., Trujillo-Mesa A. J., & Vidal-Carou M. C. (2002). Profile of biogenic amines in goat cheese made from pasteurized and pressurized milks. *Journal of Food Science*, 67, 2940–2944.

Novella-Rodríguez 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.

Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C. (2003). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science*, 68, 750-755.

Oh, S. H., Soh, J. R., Cha, Y. S. “Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms” *Journal of Medicinal Food* 6 (2003): 115–121.

Olsen R.W. and Avoli M., 1997. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* 38, 399-407.

Özer B.H. & Kirmaci H.A. “ Functional milks and dairy beverages” *International Journal of Dairy Technology* 63 (2010): 1-15.

Paape M.J., Wiggans G.R., Bannerman D.D., Thomas D.L., Sanders A.H., Contreras A., Moroni P., Miller R.H. “Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts” *Small Ruminant Research* 68 1–2 (2007):114-125.

Pasantes-Morales H., Wright C. E, Gaull G. E. “Protective effect of taurine, zinc and tocopherol on retinol-induced damage in human lymphoblastoid cells” *Journal of Nutrition* 114 (1984):2256–2261.

Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Mendes, E., Oliveira, B. M., Ferreira, M. (2001). Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chemistry*, 287-291.

Pintado, A. I. E., Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pintado, M. M. E., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. (2008). Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal*, **18**, 631–640.

Pasantes-Morales H., Moran J., Schousboe A. “Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: Properties and mechanism” *Glia* 3 (1990):427–432.

Kalac P, Krausova P.. “A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods”. *Food Chemistry* 90 (2005) 219-230.

Pavel Kalac...Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013 *Food Chemistry* 161 (2014) 27–39

Pinho O. Ferreira I.M.P.L.V.O., Mendes E., Oliveira B.M., Ferreira M., “Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão”, *Food Chemistry* 75, 287-291, (2000).

Powers, M. et. al., The Effects of Gamma Aminobutyric Acid on Growth Hormone Secretion At Rest and Following Exercise, *Medicine & Science in Sports & Exercise Vol. 35(5)*, p S271, Maggio 2003

Powers, M. et. al., Growth Hormone Isoform Responses to GABA Ingestion at Rest and after Exercise, *Medicine & Science in Sports & Exercise Vol. 40(1)*, págs. 104-110, Gennaio 2008

Rigo J, Senterre J. “Is taurine essential for the neonates?” *Biology of the Neonate* 32 (1977): 73-76.

Saransaari P., Oja S. S. “GABA release under normal and ischemic conditions” *Neurochemistry Research* 33 (2008): 962–969.

Schaffer S.W., Jong C.J., KC R., Azuma J. “Physiological roles of taurine in heart and muscle” *Journal of Biomedical Science* 17 (2010):S2.

Schmidt S.Y., Berson E.L., Hayes K.C. “Retinal degeneration in cats fed casein. I. Taurine deficiency” *Investigative Ophthalmology* 15 (1976): 47-52.

Schuller-Levis G. B., Park E. “Taurine: new implications for an old amino acid” *FEMS Microbiology Letters* 226 (2003): 195–202.

Seiler N (1990) Polyamine metabolism. *Digestion* (Suppl. 2)46, 319±330

Seiler, N., & Raul, F. (2005). Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 623–642.

Shalabi A. R. (1996). “Significance of biogenic amines to safety and human health”. *Food Research international* 29,675-690.

Silla Santos M.H., “ Biogenic amines: their importance in food“, *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, 29, 2-3, 213-321.

Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., Gobbetti, M. “Synthesis of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Variety of Italian Cheeses” *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2007): 7283-7290.



Soda, K. (2011). The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-9966-30-95>. Art. Nr 95.

Spanjer, M. C., Van Roode, B. A. S. W. (1991). Towards a regulatory limit for biogenic amines in fish, cheese and sauerkraut. *De Ware(n)-Chemicus*, 21, 139-167.

Stratton, J. E., Hutkins, R. W., Taylor, S. L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54, 460-470.

Stork O, Ji F-Y, Stork S, Yoshinobu Y, Moriya T, Shibata S, Obata K, (2000a). Decreased GABA levels and disturbance of neural functions in mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Brain Res* 65: 45-58.

Sturman J.A. "Taurine in development" *Physiological Reviews* 73 (1993), 119-148

Taylor S.L., Stratton J. E., Nordlee J. A.. Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. *Clin. Toxicology*, 27, 225-240 (1989).

Thaker, P. H., Yokoi, K., Jennings, N. B., Li, Y., Rebhun, R. B., Rousseau, D. L., Fan, D., Sood, A. K. "Inhibition of experimental colon cancer metastasis by the GABA-receptor agonist nembutal" *Cancer Biology & Therapy* 4 (2005): 753-758.

Tiedemann F., L. Gmelin (1827). Einige neue Bestandtheile der Galle des Ochsen. *Annalen der Physik* 85 (2): 326–337.

Tripaldi C., Martillotti F., Terramoccia S. "Content of taurine and other free amino acids in milk of goats bred in Italy" *Small Ruminant Research* 30 (1998): 127–136.

Vincentini A., Giaccio M., "Technological Factors influencing the formation of biogenic amines in cheese: a review", *J. Commodity Sci. Technol. Quality* 2006, 45 (I-IV).

Zoltán, S., Szente, V., Kövèr, G., Polereczki, Z., Szigeti, O. “The influence of lifestyle on health behaviour and preference for functional foods” *Appetite* 58 (2012): 406-413.

Wang, H. K., Dong, C., Chen, Y. F., Cui L. M., Zhang, H. P. “A new probiotic Cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid content produced with Koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang” *Food Technology and Biotechnology* 48: (2010) 62-70.

Wolken W.A.M., Lucas P.M., Lonvaud-Funel A., Lolkema J.S., 2006. The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 188:2198-2206.

Wong, C. G. T., Bottiglieri, T., Snead, O. C. “GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease” *Annals of Neurology* 54 (2003): S3–S12.

Wright A. R., Rees S. A., Vandenberg J. I., Twist V. W., Powell T. “Extracellular osmotic pressure modulates sodium-calcium exchange in isolated guinea-pig ventricular myocytes” *The Journal of Physiology* 488 (1995):293–301.

Yamori Y, Taguchi T, Hamada A, Kunimasa K, Mori H, Mori M. “Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies” *Journal of Biomedical Science* 17 (2010): S6, doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S6.

Zulli A. “Taurine in cardiovascular disease” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 14 (2011): 57-60.

Zhang M, Bi LF, Fang JH, Su XL, Da GL, Kuwamori T, Kagamimori S., (2003). Beneficial effects of taurine on serum lipids in overweight or obese non-diabetic subjects. *Amino Acids*. 2004 Jun;26(3):267-71.