



TESIS MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Bacterias lácticas productoras de aminos biógenas en productos lácteos.



Gonzalo Rodriguez Eguía
Tutor: Dra Matilde Soubes
Cátedra de Microbiología-DEPBIO
Facultad de Química-UDELAR
Montevideo
2014

AGRADECIMIENTOS

2014

Debería agradecer a tanta gente que me ha dado una ayuda de diversas maneras y me ha enseñado muchas cosas en el transcurso de esta etapa de conocimiento que no podría nombrar a cada uno.

Al citar alguna de ellas no puedo olvidar :

- A mi querida tutora de la cual he aprendido varias cosas buenas en más de un aspecto y le estaré agradecido siempre, Dra Matilde Soubes.
- Agradecer especialmente a la Dra Patricia Lema de la cual me llevo un buen recuerdo a través de estos años de cursos y de trabajo.
- Agradecer especialmente también al Dr Tomas López por su ayuda y la participación con Jimena y Santiago.
- No puede faltar "el" agradecimiento a la GRAN Cátedra de Microbiología, a todos sus integrantes los cuales aprecio mucho en especial al mejor Laboratorio "El 14" con sus integrantes las más buenas y lindas.
- A Martina y Lucia de ICB, Lab Ecología Química las cuales les agradezco la mano proporcionada.
- Al Director Ing Agr Luis Garat, sub directora Sonia y Ejecutivo en Colonia al cual le estoy agradecido por su respeto y apoyo.
- A mi familia la que me aguanta todo, a mis padres y hermano.
- A la ANII y CSIC.
- Un agradecimiento especial al TRIBUNAL.

INDICE

2014

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
1.Introducción.....	4
1.1.Situación de AB y Micotoxinas en quesos en Uruguay y el Mundo.....	4
1.2.Aminas Biógenas	5
1.3.Factores influenciadores en la producción de AB.....	8
1.4.Microorganismos y AB.....	9
1.5.Quesos frescos generalidades.....	11
1.6.Bacterias Acido Lácticas generalidades y su proceso en la obtención de quesos.....	13
1.7. Generalidades puntos de control, muestreo de productos lácteos para AB	19
1.8. Métodos de análisis de AB.....	20
2.Objetivos.....	22
3.Materiales y métodos.....	23
3.1. Muestras de leche y derivados	23
3.2. Recuento de aerobios totales y BAL.....	24
3.3. Aislamiento de cepas.....	25
3.4. Identificación de cepas.....	25
3.5. Propiedades Tecnológicas.....	26
3.5.1. Potencial de acidificación.....	26
3.5.2. Proteólisis.....	27
3.5.3. Lipólisis.....	27
3.6. Potencial de formación de AB y Cuantificación.....	28

INDICE

2014

3.6.1.Determinación cualitativa de producción de AB bioquímico	28
3.6.2.Determinación de potencial cualitativo de producción de AB por método molecular.....	28
3.6.3. Método para obtención y cuantificación de AB histamina y tiramina.....	30
3.6.3.1.Obtención de AB en medios de cultivo.....	30
3.6.3.2.Obtención de AB en quesos.....	30
3.6.3.3.Cuantificación de AB por HPLC.....	31
3.7.Proceso de producción de quesos danbo artesanales.....	32
3.8.Comentarios sobre métodos.....	34
4.Resultados y discusión.....	36
4.1. Recuentos de aerobios totales, BAL y coliformes.....	36
4.2. Colonias de BAL obtenidas.....	38
4.3. Identificación de aislamientos obtenidos por método bioquímico.....	39
4.4. Identificación de aislamientos obtenidos por método molecular.....	41
4.5. Propiedades tecnológicas: acidez, proteólisis y lipólisis.....	42
4.6. Potencial formador de AB por método bioquímico.....	46
4.7. Potencial formador de AB por método molecular.....	47
4.8. Cuantificación de AB Histamina y Tiramina por HPLC.....	51
4.8.1. Resultados de la cuantificación de Histamina y Tiramina en quesos danbo artesanales (A, B y C) y danbo comerciales.....	51
4.8.2. Resultados de la cuantificación de Histamina y Tiramina para aislamientos obtenidos de distintas muestras.....	52
4.8.3. Características de metodología HPLC.....	52
4.9. Discusión de resultados.....	54
5.Conclusión y perspectivas.....	56

INDICE

2014

6.Referencias.....	59
Anexo 1.....	64
Anexo 2.....	90
Anexo 3.....	93
Anexo 4.....	96

RESUMEN

2014

La seguridad de los alimentos constituye una de las preocupaciones básicas en los países desarrollados y emergentes ya que afecta directamente a la salud de todos los ciudadanos. En este contexto se sitúa la inquietud creciente, tanto por parte del consumidor como de las autoridades sanitarias, por la presencia de aquellos compuestos tóxicos que, como las aminas biógenas (AB) pueden encontrarse en los alimentos.

Las AB son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos. La descarboxilación de algunos aminoácidos, llevada a cabo por determinados microorganismos, puede provocar la presencia de concentraciones altas de AB en los alimentos, de forma que tras su ingestión pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos. Cabe destacar que hay personas especialmente sensibles a las AB debido a que las enzimas responsables de su destoxificación, la monoamino oxidasa (MAO) o la diamino oxidasa (DAO) no son funcionales bien por problemas genéticos, por la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos antidepresivos. Es difícil establecer los niveles tóxicos para cada una de las AB ya que depende de la eficacia de los sistemas de destoxificación y por lo tanto varía de unos individuos a otros. Además, también es dependiente de la presencia de otras AB ya que pueden tener efectos sinérgicos. Son muchos los factores que contribuyen a la presencia y acumulación de AB como los aminoácidos libres, pH, a_w , la concentración de sal, nivel de humedad y temperatura, potencial redox, aditivos como azúcares, densidad bacteriana y el efecto sinérgico entre microorganismos. El factor principal son los microorganismos. La presencia de microorganismos con aminoácido descarboxilasas con condiciones favorables para su crecimiento y actividad descarboxilante ayudará a aumentar la cantidad presente de AB.

Se aislaron BAL de un sistema de producción quesera estudiando el potencial de generación de aminas biógenas por diferentes métodos, así como propiedades tecnológicas de interés (potencial de acidificación y proteólisis). Dentro de las cepas aisladas se obtuvieron *Lactococcus lactis ssp lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* y flora no láctica como *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*.

Se comparó la formación de AB de aislamientos salvajes obtenidos con las de cepas comerciales utilizadas como starter en la fermentación de quesos por diferentes métodos, así como también entre 2 quesos comerciales y los producidos en forma artesanal. En cuanto a los quesos producidos artesanalmente se midió cuantitativamente las AB al avanzar la maduración.

Los resultados obtenidos mostraron alta variabilidad en cuanto a las propiedades tecnológicas trascendentes en producción quesera como potencial de acidificación y desarrollo de aminas biógenas (AB) incluso a nivel de subespecie con resultados para Histamina entre < 30.10 a $> 2526,4$ $\mu\text{g/g}$ y para Tiramina desde N/D a valores de > 2272.0 $\mu\text{g/g}$. Obteniendo también una importante variabilidad el producto final queso fresco ya sea comercial o artesanal con valores para la Histamina entre < 15.1 a > 314.5 $\mu\text{g/g}$ y para Tiramina < 13.6 a > 282.8 $\mu\text{g/g}$, pudiendo entonces utilizar cepas que siendo

RESUMEN

2014

proteolíticas tengan valor alto de potencial de acidificación y bajo nivel de formación de AB o ninguno.

Entre los diferentes métodos utilizados para determinación de AB es encontrado como mejor método a utilizar el instrumental (HPLC), siendo de todas formas de gran apoyo como método para obtener en cepas el potencial formador de AB el molecular.

1. INTRODUCCION

2014

1.1. Situación de aminas biógenas (AB) en quesos en Uruguay y el Mundo.

La seguridad de los alimentos constituye una de las preocupaciones básicas en los países desarrollados y emergentes ya que afecta directamente a la salud de todos los ciudadanos. Esta preocupación se ha visto incrementada en los últimos años debido a los incidentes que ocurren en diferentes países, que han convertido la seguridad alimentaria en un tema con gran repercusión social. En este contexto se sitúa la inquietud creciente, tanto por parte del consumidor como de las autoridades sanitarias, por la presencia de aquellos compuestos tóxicos que, como las aminas biógenas pueden aparecer en los alimentos. Aquí nos referiremos a los quesos como uno de estos alimentos.

Las definiciones generales para los quesos en nuestro país según el Reglamento Bromatológico Nacional (Decreto 315/94) son las siguientes:

“Definiciones para queso”

“Con el nombre genérico de queso se entiende el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de leche o de leche reconstituída (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario.”

“Queso fresco. Es el queso que se encuentra listo para su consumo poco después de su fabricación.”

“Queso madurado. Es el queso que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de cada tipo de queso.”

“Queso artesanal. Es el queso elaborado en condiciones artesanales, en forma individual, familiar o asociativa, exceptuando la producción masiva que implique instalaciones y procesos industriales”. (RBN, Decreto 315/94)

En cuanto a los límites para las AB, dentro del reglamento bromatológico nacional (decreto 315/94), se encuentra el límite para la histamina (para el caso de pescado) coincidiendo con la recomendación de la FAO/WHO en donde ésta no podrá superar los 100 mg/kg (100 ppm) (Contreras et al., 2007). Otra recomendación de la FAO/WHO es que el contenido total de AB no debe superar las 1000 ppm (Contreras et al., 2007) la cual ha sido generalizada en el mundo. Creemos esto se deba a la gran variabilidad en cuanto a concentraciones que presentan los productos incluso dentro de una misma pieza de queso por ejemplo y la reciente importante atención que se está prestando a las AB en diferentes partes del globo.

Al igual que en otras partes del mundo en nuestro país se comienza a investigar este tema para minimizar riesgos en la salud pública. Algunos ejemplos a citar en el extranjero son: Queso Pecorino en Italia donde las AB se encontraron en el rango de 266,7 a 5860,6 mg/kg para los producidos de leche cruda y 10,3 a 582,4 mg/kg (Schirone et al., 2013).

1. INTRODUCCION

2014

En Venezuela las AB presentaron concentraciones promedios en quesos madurados como el Manchego de 617,60 y 549,51 mg/kg, Brie de 630,80 y 823,67 mg/kg, Parmesano de 667,72 y 633,47 mg/kg (Contreras et al., 2007).

En la Comunidad Europea los límites para contaminantes se pueden encontrar en: REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (Reg. CE N° 1881/2006).

Agentes causales como la histamina (69 brotes) y las setas tóxicas (43 brotes) han sido notificados especialmente por algunos estados miembros (EM) de la Unión Europea. La cocina doméstica contribuye claramente a estos brotes, y la mitad de los brotes verificados han tenido lugar en el ámbito doméstico (Informe comunitario sobre brotes de toxiinfecciones alimentarias en la Unión Europea de 2007. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria).

1.2. Aminas Biógenas

Las AB son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos, también han sido halladas algunas aminas alifáticas que pueden ser formadas por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas. El proceso de descarboxilación puede proceder a través de dos vías bioquímicas que son la actividad de las enzimas endógenas descarboxilasa que ocurren naturalmente en los alimentos o actividad de enzimas exógenas liberadas por diversos m.o. (Spizzirri et al., 2013).

En prácticamente todos los alimentos conteniendo proteínas o aminoácidos libres y sometidos a las condiciones que permitan la actividad microbiana y bioquímica puede ser esperada la formación de AB (Spizzirri et al., 2013). Atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) y en función del número de grupo aminos de la molécula, podemos hablar de monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina) (Figura 1) (Figura 2) (Fernández y Álvarez, 2005). Estas AB están generalmente asociadas con el deterioro de alimentos ricos en proteína por la generación de AA libres precursores (Mayer et al., 2013)

1. INTRODUCCION

2014

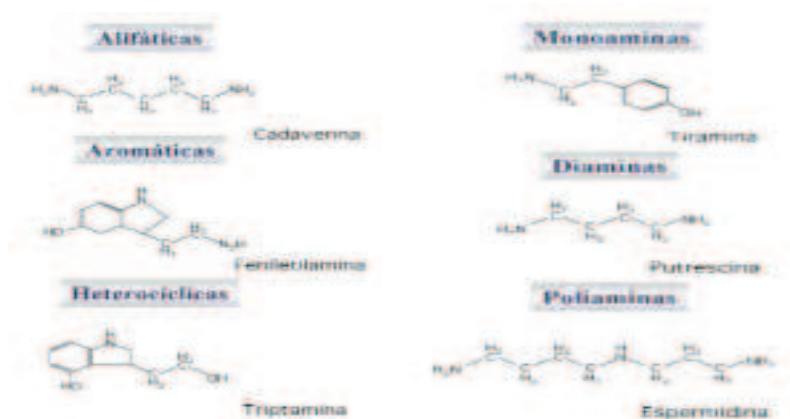


Figura 1. Clasificación de las aminas según su estructura química.

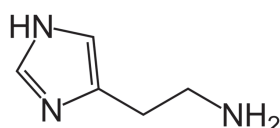


Figura 2. Histamina.

Tabla 1. Aminas biógenas en alimentos y sus efectos farmacológicos (tomada de Shalaby, 1996).

Amina biógena	Efectos tóxicos
Histamina	Síntesis de noradrenalina y adrenalina Palpitaciones Vómitos, náuseas
Tiramina	Hiper tensión Migrañas Vasoconstricción Lacrimación y salivación Incrementa el nivel de azúcar en la sangre Parálisis de las extremidades
Putrescina y cadaverina	Rigidez mandibular Bradicardia Hipotensión Potencia el efecto de otras aminas
β-feniletilamina	Hiper tensión Migrañas
Triptamina	Hiper tensión

La descarboxilación de algunos aminoácidos, llevada a cabo por determinados microorganismos, puede provocar la presencia de concentraciones altas de AB en los alimentos, de forma que tras su ingestión pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos (Tabla 1). (Fernández y Álvarez, 2005).

1. INTRODUCCION

2014

“La intoxicación producida por tiramina se conoce también como reacción del queso, debido a los altos niveles que esta AB presenta en algunos quesos. Además de su propia toxicidad, estudios recientes han demostrado que la tiramina favorece la adhesión de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 a la mucosa intestinal (Lyte, 2004). Por otro lado, diaminas como putrescina y cadaverina pueden reaccionar con nitritos dando lugar a la formación de nitrosaminas de conocido efecto cancerígeno (Fernández y Álvarez,2005). Cabe destacar que hay personas especialmente sensibles a las AB debido a que las enzimas responsables de su destoxificación, la monoamino oxidasa (MAO) o la diamino oxidasa (DAO) no son funcionales, bien por problemas genéticos o por la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos antidepresivos (Figura 3). Por tanto, es difícil establecer los niveles tóxicos para cada una de las AB ya que depende de la eficacia de los sistemas de destoxificación y por lo tanto varía de unos individuos a otros. Además, también depende de la presencia de otras AB ya que pueden tener efectos sinérgicos. Sin embargo, aunque en la actualidad no existe ninguna legislación sobre las concentraciones permitidas en los alimentos, las autoridades sanitarias recomiendan reducir al máximo la ingestión de estos compuestos. En el caso de personas con tratamientos antidepresivos basados en inhibidores de la MAO está contraindicado el consumo de queso, debido a los altos niveles de tiramina que puede contener.” (Fernández y Álvarez,2005).

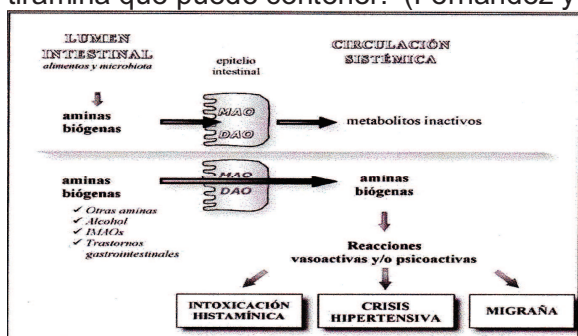


Figura 3. Efectos tóxicos de las aminas biógenas y factores potenciadores (Bover-Cid et al., 2005).

Aunque varias AB pueden jugar un rol importante en funciones fisiológicas, su presencia en alimentos es siempre indeseable porque si se absorbe a concentraciones demasiadas altas pueden inducir dolores de cabeza, dificultad respiratoria, palpitaciones del corazón, hipo u hipertensión y varios trastornos alérgicos. Estos compuestos pueden representar serios problemas a la salud para humanos y animales cuando están presentes en cantidades significativas en alimentos o se consumen en presencia de factores potenciadores tal como drogas inhibidoras de las amino oxidasas, alcohol y desordenes gastrointestinales (Spizzirri et al., 2013).

No todas las AB son igualmente tóxicas, histamina (HIS), tiramina (TYR) y feniletilamina (PHE) son de gran preocupación, las dos primeras pueden ver potenciados sus efectos tóxicos por la presencia de putrescina (PUT) y cadaverina (CAD) por inhibición de monoaminoxidasa, diaminoxidasa y

1. INTRODUCCION

2014

hidroximetil transferasa (Spizzirri et al., 2013). La severidad de los síntomas clínicos relacionados a la intoxicación por AB dependerá entonces de la cantidad y tipo de AB ingerida y del correcto funcionamiento del sistema de detoxificación, el cual puede ser influenciado por la susceptibilidad humana, desorden genético, fumar, consumo de medicación (en particular inhibidores de MAO) o bebidas y alimentos ricos en AB (Loizzo et al., 2013).

La cantidad total de diferentes aminos es fuertemente variable dependiendo de la naturaleza del alimento y los microorganismos involucrados. (Spizzirri et al., 2013).

La presencia de AB en alimentos no fermentados generalmente indica almacenamiento inadecuado o prolongado, por otro lado su presencia en alimentos fermentados puede ser inevitable por la difusión de descarboxilasas de BAL (Spizzirri et al., 2013).

Especial atención es requerida para alimentos fermentados o para la elaboración de alimentos inadecuada y condiciones de almacenamiento inapropiado. Vino, queso, cerveza, embutidos y extracto de levadura pueden contener bacterias responsables de la producción y acumulación de AB (Sciancalepore et al., 2013).

1.3. Factores influenciadores en la producción de AB

Son muchos los factores que contribuyen a la presencia y acumulación de AB como por ejemplo los aminoácidos libres, pH, aw, la concentración de sal, nivel de humedad y temperatura, potencial redox, aditivos como azúcares, densidad bacteriana y el efecto sinérgico entre microorganismos. El factor principal son los microorganismos (Schirone et al., 2011).

El pH es un factor clave de influencia en la actividad de aminoácido descarboxilasa. La aminoácido descarboxilasa bacteriana usualmente tiene un pH óptimo ácido (Gardini y Suzzi, 2003).

La variación en la cantidad de agua y en la relación sal/agua durante la fermentación y almacenamiento de salchichas, embutidos juegan un importante rol en la multiplicación microbiana. La velocidad de producción de amina para la cepa *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* se vio considerablemente reducida cuando la concentración de sal del medio se incrementó de 0 a 6%. Esta influencia podría ser atribuida a la reducción de los rendimientos celulares obtenidos en la presencia de altas concentraciones de NaCl y a un progresivo disturbio de la membrana localizando enzimas descarboxilasas microbianas (Gardini y Suzzi, 2003).

En cuanto al factor potencial redox, piezas distintas por ejemplo de diferente diámetro para salchichas y embutidos difieren en el grado y valores de anaerobiosis, potencial redox, concentración de sal y a_w . En este caso el

1. INTRODUCCION

2014

diámetro de las salchichas y embutidos afecta el ambiente en el cual crecen los m.o. (Gardini y Suzzi, 2003)

Es bien conocido que la temperatura tiene un marcado efecto en la formación de AB en la industria pesquera y quesera. Muchos autores han reportado que el contenido de AB depende de la temperatura e incrementa con el tiempo y temperatura de almacenamiento. La temperatura influencia las relaciones entre las actividades de los distintos m.o. presentes en salchichas y embutidos, puede tener efecto contrario, acumulando AB. Esta variable de hecho ejerce diferentes influencias en muchos fenómenos relacionados a la producción de AB tal como cinética de crecimiento, los rendimientos celulares y actividad enzimática. Además en los efectos de la actividad de enzimas proteolíticas y descarboxilantes y la relación entre la población de m.o. (Gardini y Suzzi, 2003).

En otras palabras la presencia de AB en alimentos es consecuencia de un complejo equilibrio entre la composición de los alimentos y la actividad enzimática de la población microbiana (Gardini y Suzzi, 2003).

1.4. Microorganismos y AB

El aumento en el contenido de amina del queso puede ser atribuible a diversos m.o. que posean actividad amino ácido descarboxilasa. Los mismos pueden ser hallados entre los starters de bacterias ácido lácticas (BAL), BAL no starters y/o otra microflora espontanea (Loizzo et al., 2013).

Es difícil de encontrar una correlación lineal entre los recuentos microbianos y el contenido de AB en queso porque la habilidad de producción de aminas de diferentes cepas de diversas bacterias difieren considerablemente (Loizzo et al., 2013).

En muchos casos la acumulación de AB ha sido atribuida principalmente a la actividad de la microflora no starter (Loizzo et al., 2013).

Un rol indirecto de los Starter de BAL puede plantear la hipótesis de que las peptidasas liberadas por la lisis de BAL de los starter, podría ser esencial para proveer amino ácidos precursores (Loizzo et al., 2013).

Durante el proceso de fermentación la formación de AB puede ser controlada por el uso de cultivos starter que sean menos efectivos en la descarboxilación de amino ácidos, siendo la incapacidad de producir AB considerada como una condición indispensable de las cepas a ser utilizadas como starter (Loizzo et al., 2013).

1. INTRODUCCION

2014

A este respecto, la European Food Safety Agency (EFSA) ha introducido recientemente un sistema para la evaluación de seguridad previa a la comercialización de los grupos taxonómicos seleccionados de m.o. que conduce a un “Qualified Presumption of Safety” (QPS) equivalente Europeo de status “Generally Recognized As Safe” (GRAS). Otro enfoque para reducir AB en quesos es la utilización de cultivos starter con amino oxidasa capaz de degradar AB (Loizzo et al., 2013).

Los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y la familia *Enterobacteriaceae* todos contienen alguna cepa que ha sido descrita como productora de amina en el queso (Loizzo et al., 2013).

El género *Lactobacillus* comprende una gran variedad de especies comúnmente identificadas en productos lácteos y dominando generalmente la microbiota en todos los quesos (Loizzo et al., 2013).

Enterococci comprende una parte importante de la microbiota de cuajada del queso fresco y en algunos casos ellos son los m.o. predominantes en el producto totalmente madurado alcanzando cifras de hasta 10^6 - 10^8 ufc g⁻¹. Sus niveles en diferentes quesos dependerán de la extensión de contaminación en la leche y su supervivencia y desarrollo bajo las condiciones particulares de manufactura y maduración de los quesos (Loizzo et al., 2013). Las especies más comúnmente aisladas en queso son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, seguido por *Enterococcus durans* (Loizzo et al., 2013).

Los *Enterococci* son considerados formadores de TYR (Loizzo et al., 2013).

Las variedades de queso fresco son muy populares en América Latina, estos representan 80% de los quesos consumidos en México. Se ha confirmado en estos quesos aislados de *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus sp.* *Leuconostoc sp.* los cuales son los más prevalentes (Lacroix et al., 2013).

1. INTRODUCCION

2014

1.5. Quesos Frescos Generalidades

En el presente trabajo se utilizaron quesos Danbos de origen industrial y de propia elaboración artesanal a partir de leche cruda e iniciadores naturales.

La definición de Queso Danbo según el RBN, Dec. 315/94 (actualización 2011 “Identidad y Calidad del Queso Danbo”) es la siguiente: Con el nombre de Queso DANBO se entiende el queso madurado que se obtiene por coagulación de la leche por medio del cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas, complementada o no por la acción de bacterias lácticas específicas.

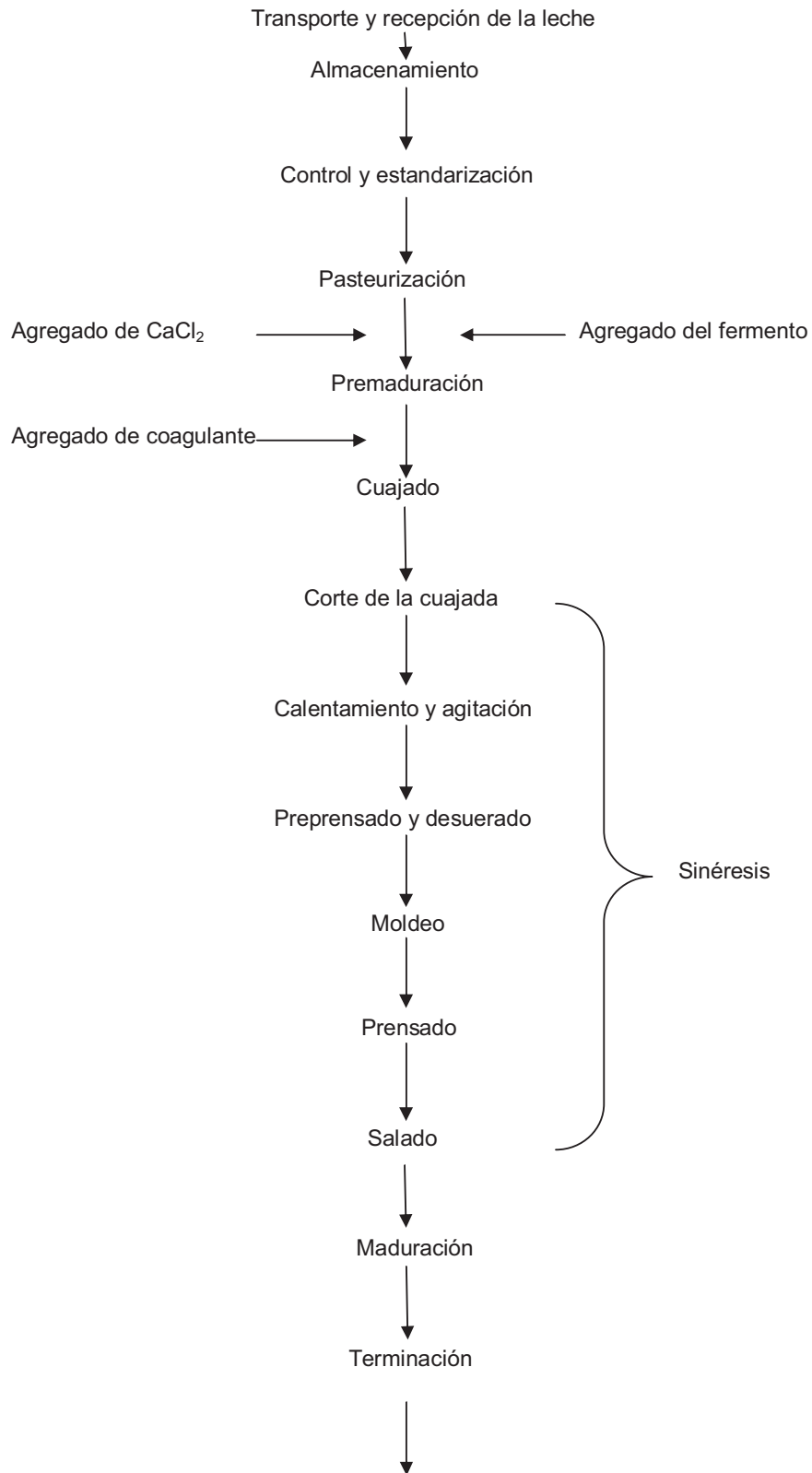
Descripción del queso Danbo según el codex: “El Danbo (o Dambo) es un queso firme/semiduro madurado de conformidad con la Norma General para el Queso (CODEX STAN 283-1978). El cuerpo presenta un color que varía de casi blanco o marfil a amarillo claro o amarillo y tiene una textura firme (al presionarse con el pulgar) que se puede cortar, con pocos a abundantes agujeros ocasionados por el gas, redondos y suaves, del tamaño de arvejas (guisantes) (con un diámetro máximo de 10 mm) uniformemente distribuidos, aunque se aceptan algunas pocas aberturas y grietas. Tiene una forma cuadrada o de paralelepípedo. El queso se elabora y vende con o sin una corteza dura o ligeramente húmeda, madurada con un ligero desarrollo graso, y puede tener un revestimiento. (por ejemplo pintura plástica).

En el caso del Danbo listo para el consumo, el procedimiento de maduración para desarrollar las características de sabor y cuerpo es, normalmente, de no menos de 3 semanas a 12–20 °C, según el nivel de madurez requerido. Pueden utilizarse distintas condiciones de maduración (incluida la adición de enzimas para intensificar el proceso) siempre que el queso muestre propiedades físicas, bioquímicas y sensoriales similares a las conseguidas mediante el procedimiento de maduración previamente citado. El Danbo destinado a posterior procesamiento no necesita presentar el mismo nivel de maduración cuando esto se justifique debido a necesidades de tipo técnico o comerciales” (www.codexalimentarius.org).

El Proceso General de Producción de Queso, implica una serie de etapas las cuales muchas de ellas son comunes a la obtención de queso (Figura 4).

1. INTRODUCCION

2014



1. INTRODUCCION

2014



Figura 4. Diagrama elaboración del queso (www.inti.gov.ar)

1.6. Bacterias Acido Lácticas (BAL) generalidades y su proceso en la obtención de quesos

Las BAL son bacterias gram (+), cocos o bastones, no formadoras de esporas, catalasa (-), desprovistas de citocromos, de hábitat no aeróbico pero aerotolerantes, ácidotolerantes y estrictamente fermentativas (el ácido láctico es el principal producto en la fermentación de los azúcares). Estas incluyen los géneros Bacilos (*Carnobacterium*, *Lactobacillus*) y Cocos (*Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*) (Khalid, 2011; Spano et al, 2010).

Los hábitats comunes para estos m.o. son ricos en nutrientes como el caso de productos alimenticios (productos fermentados a partir de la leche, carne, frutas, vegetales), mucosas de mamíferos (boca, intestino, vagina), plantas y materiales originados de estas. Presentan requerimientos nutricionales complejos para carbohidratos, aminoácidos, péptidos, esteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácido nucleico y vitaminas (Falkow, 2006).

Las BAL crecen en una variedad de hábitats como se mencionó siempre que existan, altos niveles de carbohidratos solubles, productos de degradación de proteínas, vitaminas y baja concentración de oxígeno (Falkow, 2006).

Dentro de las importantes funciones de un fermento láctico presentamos (Alais C., 1985; Fox P., 2004; Panizzolo L.A. et al., 2011):

- La acidificación de la leche y la masa del queso.
- La proteólisis de la masa del queso durante la maduración que permite también el desarrollo del flavor.
- La aromatización de la masa del queso.
- La protección del producto hacia m.o. alterantes y patógenos.

1. INTRODUCCION

2014

FERMENTACION

Azúcares $\longrightarrow$ ácido láctico (+ otros productos)

El ácido láctico principal producto de la fermentación, es un ácido no volátil inodoro, da sabor picante, antiséptico.

La fermentación de hexosas se puede llevar a cabo a través de la glicólisis vía Embden-Meyerhof pathway, esta es utilizada por todas las LAB, excepto leuconostocs, lactobacilos (grupo 3), oenococos y weissellas. Se obtiene ácido láctico como único producto final, por lo cual esta vía será homofermentativa (Figura 5). (Khalid, 2011).

Glucosa $\longrightarrow$ 2 ácido láctico + 2 ATP

Esta vía generalmente se prefiere en procesos de elevada acidificación como por ej. el yogur.

Otra vía por la cual es llevada a cabo la fermentación es Pentosa-Fosfato o Pentosa Fosfocetolasa donde el producto final será ácido láctico más otros productos, por lo cual esta vía será heterofermentativa (Figura 5). (Khalid, 2011).

Glucosa $\longrightarrow$ ácido láctico + CO₂ + etanol + ATP

En algunos casos se obtiene también como producto ácido acético. Se suelen utilizar junto a cepas homofermentativas.

1. INTRODUCCION

2014

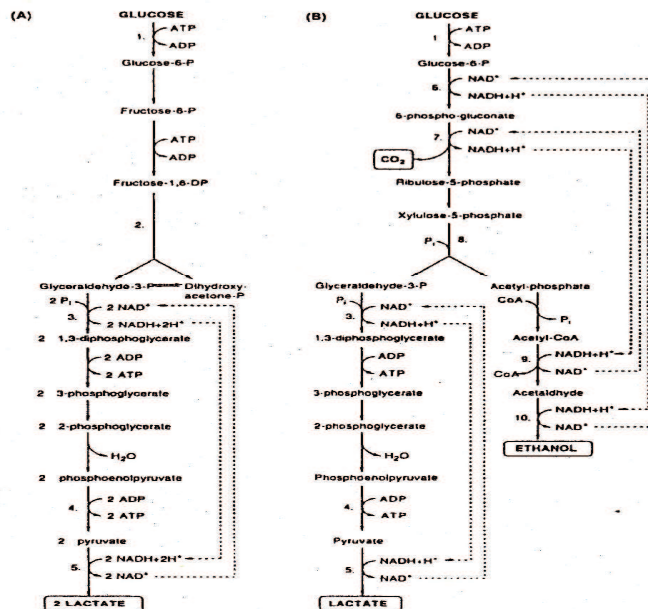


Figura 5. (A) Fermentación homoláctica, (B) Fermentación heteroláctica (tomado de Salminen S., 2004).

Disacáridos como Lactosa son también fermentables por parte de BAL (Figura 6). (Chacón, 2012).

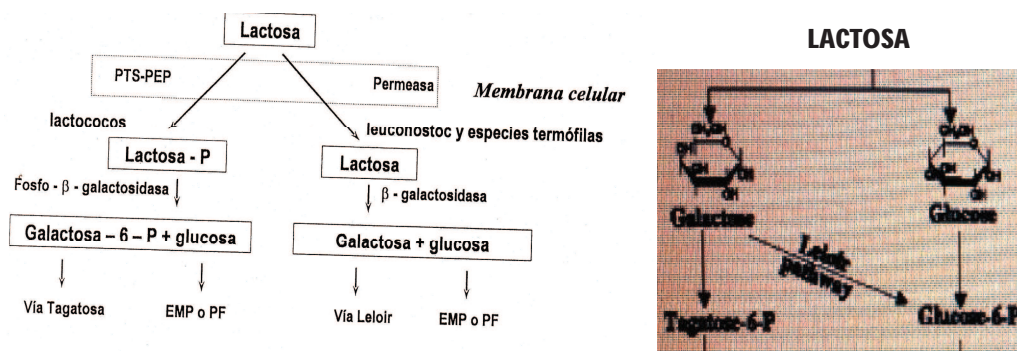


Figura 6. Fermentación de disacáridos, lactosa.

1. INTRODUCCION

2014

Teniendo en cuenta los distintos géneros de BAL hay diferencias en su forma y potencial de generación de acidez la cual es una propiedad tecnológica de alta importancia para este tipo de m.o. responsables de la fermentación.

Otra propiedad tecnológica de importancia en la producción de productos lácteos como por ej. el queso además de la acidez generada, es el nivel de proteólisis generado por las BAL. La importancia de la proteólisis desde el punto de vista de estos m.o. es la generación de aminoácidos como fuente de nitrógeno para su desarrollo (Importancia biológica).

Desde el punto de vista tecnológico podemos decir que la importancia reside en más de un aspecto como ser precursores de aromas y sabores a medida de ir avanzando en la maduración de diferentes quesos y otros productos en donde se aplique fermentación.

Cuando se habla de sabores y aromas en productos lácteos son importantes los microorganismos. *Lactococcus lactis*, *Streptococcus térmofilos* producen ácido láctico, acetaldehído y etanol (Chacón, 2012).

Durante la maduración del queso las reacciones bioquímicas que llevan a la formación de aromas y sabores parten de Lactosa, los Lípidos y las Proteínas (Figura 7) (Chacón, 2012)

La lactosa es hidrolizada produciendo glucosa y galactosa, la glucosa se oxida a piruvato vía glicólisis (Embden Meyerhof) y galactosa a glucosa 6-p. El piruvato es importante en la formación de compuestos de cadena corta como el diacetilo, acetato, acetaldehído y etanol. El citrato se hidroliza para producir acetolactato, diacetil (Chacón, 2012).

Los lípidos del queso se oxidan o se hidrolizan, sin embargo la oxidación es limitada a causa del bajo potencial redox de los quesos. Los triglicéridos de cadena corta son de considerable impacto en el sabor, pero una excesiva lipólisis es contraproducente en el sabor de los quesos pues le da un sabor rancio (Chacón, 2012).

1. INTRODUCCION

2014

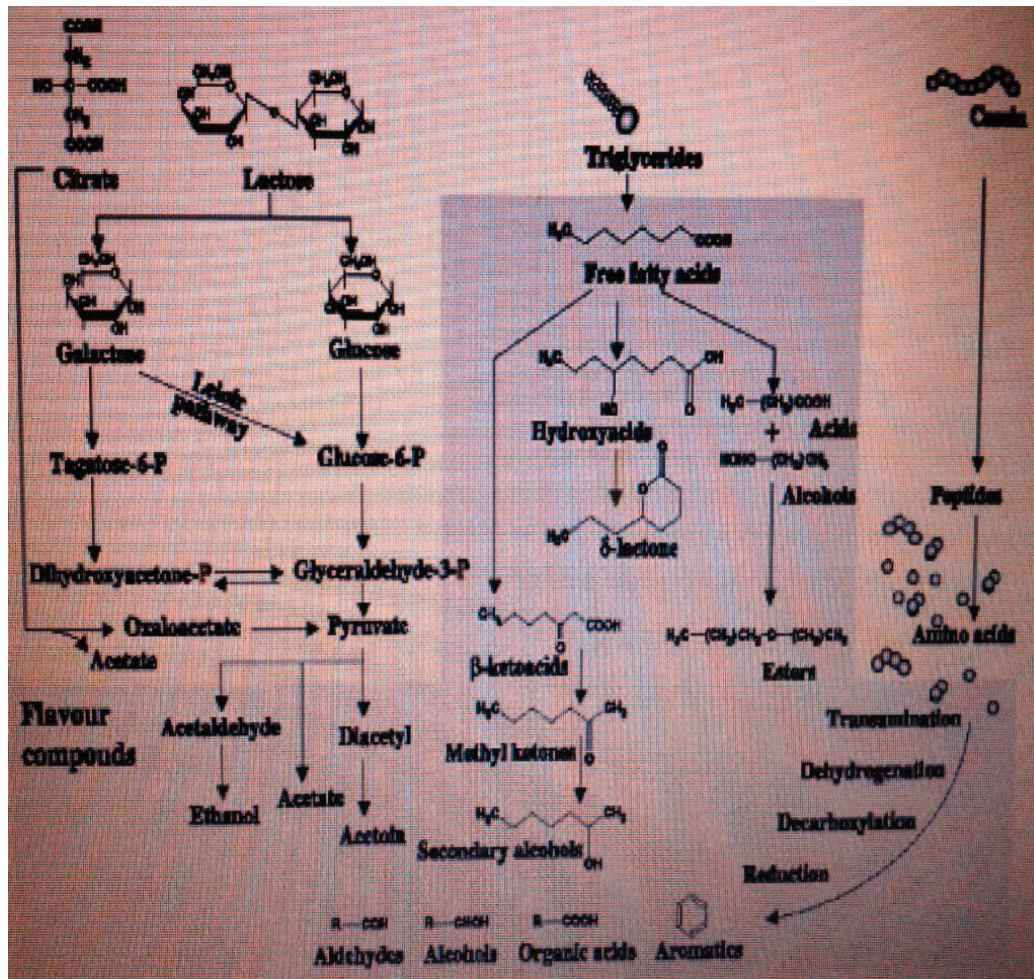


Figura 7. Rutas metabólicas de compuestos del queso.

La proteólisis contribuye a los sabores en los quesos por liberación de péptidos y aminoácidos; estos últimos son sustratos para la transaminación, deshidrogenación, descarboxilación y reducción, cuyo resultado es la amplia producción de moléculas que dan diferentes sabores como el ácido fenil acético, fenetanol, p-cresol, metanotiol, dimetilsulfuro, 3- metilbutirato, 3- metilbutanol, 2-butanona entre otras (Chacón, 2012).

La proteólisis es el más complejo e importante evento bioquímico que ocurre durante la maduración del queso (Fox P., 2004). Esta característica es importante para la textura del queso por hidrólisis de la matriz para-caseína lo que le da al queso su estructura mediante el aumento de la capacidad de unión de agua de la cuajada (Fox P., 2004).

1. INTRODUCCION

2014

Los péptidos tienen un impacto directo en el flavour del queso. En la mayoría de las variedades de queso, la hidrólisis inicial de las caseínas es causada por el coagulante, en menor grado por la plasmina y tal vez proteinasas de células somáticas lo cual resulta en la formación de péptidos de tamaños largos e intermedios (Figura 8) (Fox P., 2004).

Los péptidos anteriores son luego hidrolizados por el coagulante y enzimas de la flora starter y no starter del queso (Figura 8) (Fox P., 2004).

La producción de pequeños péptidos y aminoácidos es causada por la acción de proteinasas y peptidasas de microorganismos (Figura 8) (Fox P., 2004).

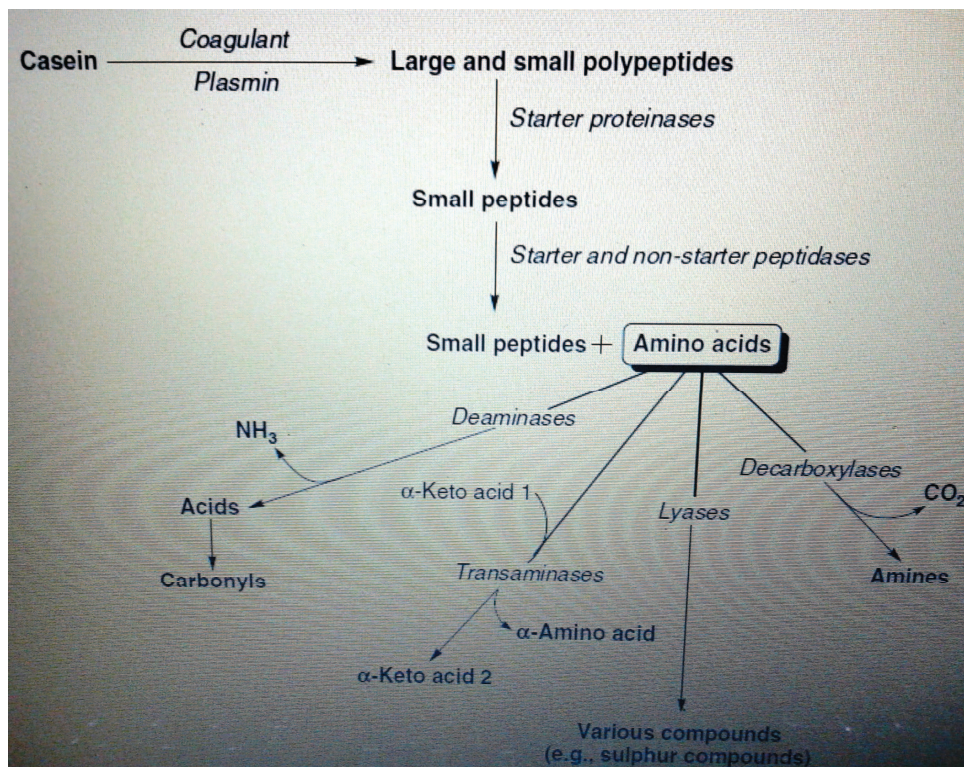


Figura 8. Resumen de la proteólisis y catabolismo de aminoácido en queso durante la maduración.

Las BAL (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) poseen un sistema proteolítico muy completo (Figura 9) (Fox P., 2004).

1. INTRODUCCION

2014

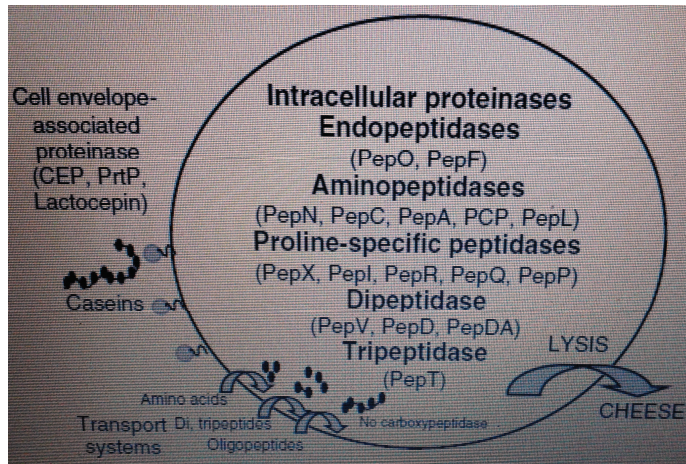


Figura 9. Resumen del sistema proteolítico de *Lactococcus*. El sistema proteolítico de otras bacterias ácido lácticas son generalmente similar.

Como se manifestó anteriormente, los aminoácidos son los precursores de las AB por lo que podríamos decir que del punto de vista toxicológico esta propiedad es de alta importancia ya que cepas que tengan distintos potenciales de proteólisis tendrán la posibilidad de mayor o menor producción de AB.

1.7. Generalidades puntos de control, muestreo de productos lácteos para AB.

Los principales puntos de control en la elaboración de productos lácteos son los relativos a la revisión inicial de las materias primas (la leche) y los tratamientos térmicos a los que la leche puede ser sometida. La primera etapa es común en todos los productos lácteos, mientras que la segunda no se aplica necesariamente en determinadas variedades de queso (ICMSF, Editorial Acribia, 1999).

El control de las materias primas (leche) es fundamental para eliminar los peligros químicos, como la presencia de antibióticos, aminos biógenas, cuya eliminación no puede ser garantizada por ninguna etapa posterior del proceso al ser en general sustancias resistentes a las altas temperaturas. También es muy importante el control para garantizar la eficacia de los tratamientos térmicos posteriores frente a los peligros biológicos y químicos, ya que estos últimos son directamente dependientes en un principio de la carga inicial y del tipo de microbiota presente en la leche. Es fundamental el control de las temperaturas de conservación de la leche previas al tratamiento térmico. El control en origen de la materia prima empleada, la leche, así como un uso

1. INTRODUCCION

2014

adecuado de antibióticos en el ganado, contribuye a mejorar la seguridad de los lácteos (ICMSF, Editorial Acribia, 1999).

La elaboración de productos como el queso incluye etapas posteriores a la pasteurización durante las que es fácil una contaminación cruzada la cual en nuestro caso podría formar aminas biógenas por lo que otro punto de control será el producto terminado.

1.8. Métodos de análisis de AB

En cuanto a los métodos de análisis oficiales de control y más desarrollados en trabajos científicos para estos parámetros encontramos el método de análisis instrumental HPLC.

El método de determinación de aminas biógenas más utilizado según trabajos científicos consultados, bibliografía (Junega y Sofos, 2010) y organismos de control oficiales [REGLAMENTO (CE) no 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, el cual lo referencia como método oficial (tomado de la AOAC)], es HPLC. Pueden ser utilizados métodos en los alimentos basados en cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida (HPLC), cromatografía gaseosa (GC), ensayos bioquímicos y electroforesis capilar (Junega y Sofos, 2010).

La HPLC es la técnica más reportada para simultáneamente separar y cuantificar estas toxinas. El análisis por GC no es muy común aunque hay métodos basados en su uso solo o combinado con espectrometría de masa (Junega y Sofos, 2010).

Según lo trabajos científicos consultados encontramos tres grandes grupos de análisis de AB, tanto en forma directa utilizando diferentes técnicas de análisis instrumental (HPLC y UHPLC) o indirecta a través de pruebas bioquímicas utilizando un medio general con un indicador y aminoácido a ensayar como medios Niven's y estudiando también su potencial de formación por parte de m.o. a través de herramientas moleculares.

En cuanto a un análisis bioquímico cualitativo, la producción de AB es testada por inoculación de cada cepa en un medio descarboxilasa modificado. El medio contiene el correspondiente aminoácido precursor y purpura de bromocresol como indicador pH (Muñoz et al., 2003). Un medio comúnmente utilizado para la detección de aminoácido descarboxilasa es el agar modificado Niven's (Muñoz et al., 2012).

1. INTRODUCCION

2014

Durante las dos últimas décadas han sido desarrollados métodos moleculares para la detección de bacterias productoras de AB. La detección temprana de bacterias productoras de AB es importante en la industria porque estas pueden ser causa de intoxicación. Por lo tanto el uso de métodos para la temprana y rápida detección de estas bacterias es importante para prevenir la acumulación de AB en productos alimentarios. Métodos moleculares para la detección e identificación de bacterias productoras de AB en alimentos son una alternativa favorable a los métodos tradicionales de cultivo. PCR se ha convertido en un importante método y ofrece la ventaja de velocidad, sensibilidad, simplicidad y detección específica de genes específicos (Muñoz et al., 2007).

Ya que los métodos moleculares son rápidos, seguros e independientes del cultivo, son una alternativa interesante para resolver las deficiencias de los métodos tradicionales. Por otra parte los métodos moleculares detectan el riesgo potencial de formación de AB en alimentos antes que se produzca la amina (Muñoz et al., 2007).

Puede ser por ejemplo utilizado para el método molecular un conjunto de cebadores de consenso basados en la secuencia del gen de la histidina descarboxilasa (*hdc*) de diferentes bacterias para la detección de bacterias productoras de histamina. Se han desarrollado PCR multiplex basadas en el cebador de *hdc* y los recientemente creados cebadores dirigidos para el gen tirosina descarboxilasa (*tyrdc*) (Coton y Coton, 2005).

Los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de AB están basados en métodos cromatográficos siendo HPLC el más explotado (como se expuso anteriormente) debido a la baja volatilidad y la falta de cromóforos de la mayoría de AB. La mayoría de los ensayos utiliza detección fluorométrica y UV con técnicas de derivatización pre o postcolumna con diferentes agentes como por ej. cloruro de dansilo (Loizzo et al., 2013; Önal et al., 2013) (Anexo I).

Como las AB derivan de aminoácidos, métodos sensibles para la detección de ambas clases de compuesto han sido desarrollados (Restuccia & Loizzo).

2. OBJETIVOS

2014

Objetivo General

Estudiar la posibilidad de hallar microorganismos "nativos" del propio ecosistema "lácteo" con propiedades tecnológicas adecuadas para un proceso de obtención de queso eficiente y con mínimo riesgo de intoxicación por aminas biógenas (AB)

Objetivos Específicos

- 1- Estudiar la evolución cuali y cuantitativa de la flora aerobia y láctica en leche, suero-cuajo y quesos obtenidos bajo condiciones no tradicionales.
- 2- Aislar e identificar fenotípica y genotípicamente m.o. predominantes de muestras de leche, suero-cuajo, quesos producidos artesanalmente
- 3- Medir el potencial y producción de AB por parte de cepas aisladas utilizando:
 - a. Método Bioquímico
 - b. Método molecular
- 4- Evaluar la producción de AB (tiramina e histamina) a lo largo del proceso de maduración de queso artesanal y en quesos comerciales, así como también para cepas BAL aisladas.

3. Materiales y Métodos

2014

3.1. Muestras de leche y derivados

Las muestras utilizadas fueron obtenidas de queseros artesanales del Departamento de Colonia e industrias de pequeño y gran porte del mismo departamento. En cuanto a la muestra de “starter comercial” liofilizado importado utilizado, el mismo fue donado por una empresa también del Departamento de Colonia.

Tabla 2. Muestras utilizadas durante el transcurso del presente trabajo.

Muestras utilizadas		Procedencia
1	Leche Cruda	Quesero artesanal
2	Suero-Cuajo	Quesero artesanal
3	Leche Premadurada a 12 °C-12h	Quesero artesanal
4	Leche Premadurada a 25 °C-36h	Laboratorio
5	Quesos Artesanales (0, 19, 30 y 40 días de maduración)	Laboratorio
6	Queso Artesanal 1er y 2da prueba (fermento natural)	Laboratorio
7	Queso Dambo Comercial es	Industria pequeño porte
8	Queso Dambo Comercial p	Industria gran porte
9	Starter liofilizado Comercial	Empresa

De las muestras 1-4, 6 y 9 se obtuvieron los aislamientos trabajados. El starter liofilizado comercial (9) es utilizado en la elaboración de la muestra 7.

En el caso de la muestra 5, quesos artesanales la misma se desglosa de la siguiente manera (Tabla 3):

3. Materiales y Métodos

2014

Tabla 3. Quesos artesanales elaborados con diferentes fermentos.

Muestra	Tipo fermento	Tiempo de maduración (días)	Muestra
A	Natural	0	A1
		19	A2
		30	A3
		40	A4
B	Natural + Comercial	0	B1
		19	B2
		30	B3
		40	B4
C	Comercial	0	C1
		19	C2
		30	C3
		40	C4

Los quesos artesanales 1er y 2da prueba, pertenecientes a la muestra 6 son elaborados con fermento natural coincidiendo con muestra A.

Las elaboraciones artesanales de queso son producidas utilizando la leche cruda premadurada a 25°C por 36 h.

3.2. Recuento de aerobios totales y BAL

El recuento de aerobios totales fue logrado mediante la utilización de Petrifilm® para aerobios en los cuales fue sembrado 1mL de diferentes diluciones (-3, -5 y -7) e incubados en estufa a 30°C, 48 h.

El recuento de BAL fue logrado a través del sembrado de 0,1mL en superficie de diferentes diluciones (-3, -5 y -7) en dos medios de cultivo M17 y MRS de las siguientes formas:

- 1- MRS, anaerobiosis en cilindro, estufa 30°C, 48 h mínimo.
- 2- MRS, anaerobiosis en cilindro, estufa 45°C, 48 h mínimo.
- 3- M17, anaerobiosis en cilindro, estufa 30°C, 48 h mínimo.
- 4- M17, anaerobiosis en cilindro, estufa 45°C, 48 h mínimo.
- 5- M17, aerobiosis, estufa 30°C, 48 h mínimo.

(Franciosi et al., 2011b; Franciosi et al., 2011c).

3. Materiales y Métodos

2014

Para la obtención de las diluciones se toman 25 g o mL de muestra según corresponda y se agrega 225 mL de suero fisiológico para luego homogenizar en stomacher (dilución -1).

3.3. Aislamiento de cepas

El aislamiento de cepas bacterianas para su posterior estudio fue llevado a cabo transportando cada cepa seleccionada desde su medio de cultivo de crecimiento tal como se explicó en punto 3.2., por medio de un ansa estéril, a una placa conteniendo el mismo medio de cultivo del cual proviene.

El criterio de selección de los aislamientos fue tomar de las diferentes placas de recuento en superficie para BAL, colonias que difirieran en su morfología. De estas últimas se tomaron 3 en el caso de la que se encontraran en mayor cantidad y 2 de las demás colonias.

3.4. Identificación de cepas

Para la identificación de las cepas BAL obtenidas de la primera prueba de obtención de queso luego de aisladas las cepas en sus respectivos medios fue utilizado un método fenotípico como la batería de pruebas bioquímicas de la empresa Biomerieux® para identificación de bacterias lácticas Gram + api® CHL 50.

En el caso de las cepas aisladas de leche cruda y demás muestras como suero-cuajo, leche cruda premadurada y queso de la segunda prueba, las mismas se identificaron utilizando método molecular. La dificultad de obtener ADN de las cepas obligó a desarrollar un método durante la realización de este trabajo, realizándose de la siguiente forma:

- 1- Rotura de pared celular: el ADN de BAL las cuales contienen gruesas paredes propias de Gram + dando dificultad a la hora de ser rotas por métodos enzimáticos comunes para posteriormente lograr extraer el ADN, fueron rotas utilizando un disruptor celular mini bead beater.

En un tubo eppendorff de 1,5 mL se colocan 1mL de agua destilada y se obtiene una suspensión de la bacteria a extraer el ADN y se centrifuga a 12500 rpm durante 5 min repitiendo de forma de obtener un pellet. Se agregan las perlas de vidrio, 0.5 g de perlas de 106 µm de diámetro y 0.1g de perlas de 2 mm de diámetro y se homogeniza 30s a 2500rpm.

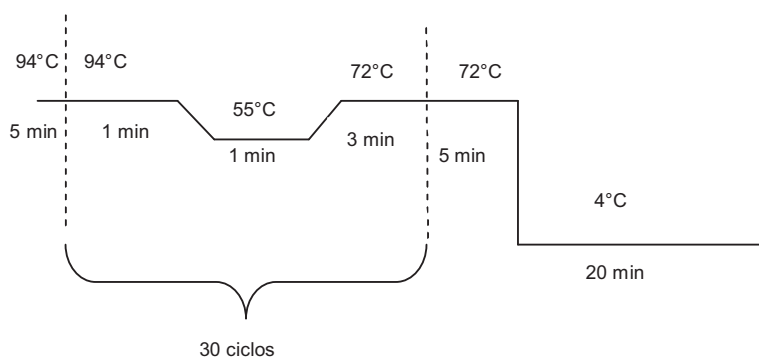
- 2- Extracción del ADN bacteriano: homogenizado el eppendorff se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto a 4°C. El sobrenadante es

3. Materiales y Métodos

2014

tomado para colocarlo en una columna y el ADN es extraído entonces utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue Kit de QUIAGEN.

- 3- Visualización del producto de extracción: electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio.
- 4- Amplificación del gen 16s ADNr: para la amplificación se utilizaron los cebadores EUB 1525R y EUB 27F de la empresa MacroGen y Mastermix 2x de Fermentas. La PCR fue llevada a cabo en termocicladores Multi Gene II de LABNET y ARKTIK de THERMO SCIENTIFIC con el ciclo:



- 5- Visualización de los productos de PCR: electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio.
- 6- Secuenciación del gen 16s ADNr y comparación con banco de datos como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.)

En el caso de las visualizaciones de productos tanto de extracción de ADN como de las amplificaciones por electroforesis fue utilizado el marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder Plus de Fermentas.

3.5. Propiedades Tecnológicas

Las propiedades tecnológicas ensayadas para los aislamientos fueron potencial de acidificación, proteólisis y lipólisis.

3.5.1. Potencial de acidificación.

Para la medición del potencial de acidez fue utilizado un método desarrollado en este trabajo el cual consta de en un medio OF modificado (el cual es colocado en placa) y se siembra en el centro 0.1mL de una solución Mcfarland 0.5. Estas placas fueron incubadas en las condiciones en las cuales se obtiene el aislamiento que al ir desarrollándose y produciendo ácido el mismo difundirá

3. Materiales y Métodos

2014

tornando el medio amarillo (o sea virando de verde a amarillo) en forma de circunferencia. Es la medida de esta circunferencia la que indicara el potencial de acidificación comparativa entre los diferentes aislados. Se ha tomado como referencia bajo potencial cuando al cabo de 48 h para nuestro caso la placa en su totalidad es color verde lo que indica no se ha generado ácido, medio cuando la medida de la circunferencia es la cuarta parte de la placa, media-alta cuando ocupa media placa, alta tres cuarta placa, muy alta la totalidad de la placa amarillo intenso (Figura 10).

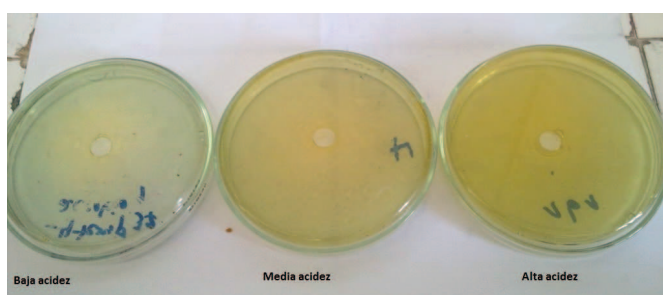


Figura 10. Potencial de acidificación

3.5.2. Proteólisis

Los ensayos de potencial proteolítico fueron llevados a cabo en medio agar leche. Las placas de medio fueron sembradas en superficie con 0.1 mL de una solución 0.5 Mcfarland e incubadas en las mismas condiciones en las que fue obtenido el aislamiento a ensayar por 72 h. Los aislamientos positivos se evidencian por la aparición de una zona clara alrededor de la colonia.

3.5.3. Lipólisis

En el caso de la propiedad lipólisis fue utilizado un medio desarrollado en Cátedra de Microbiología en el cual fue sembrado en superficie el aislamiento a ensayar e incubado en estufa durante 72 h y en las mismas condiciones en las cuales se obtuvo el aislamiento a ensayar. Los aislamientos positivos se evidencian por la formación de un precipitado (Panizza P., 2013).

3. Materiales y Métodos

2014

3.6. Potencial de formación de AB y Cuantificación

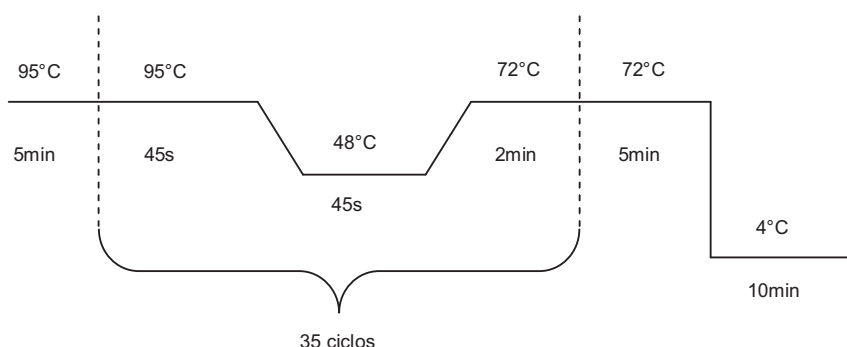
3.6.1. Determinación cualitativa de producción de AB bioquímico (Muñoz et al., 2012)

Para la medición del potencial de formación de AB fue utilizado un medio de Niven's modificado. Este medio consta de la siguiente composición: triptona, extracto de levadura, agar, NaCl, CaCO₃, purpura de bromocresol, pH= 5.3 y aminoácido ensayado como histidina, tirosina, cisteína, aspártico, ornitina, ác. glutámico, lisina y alanina. El medio fue sembrado en superficie con el aislamiento a ensayar e incubado por 72 h en las mismas condiciones en las cuales se obtuvo dicho aislamiento. En el caso de que exista actividad aminoácido descarboxilasa, luego de la incubación se ve alrededor de las colonias un color purpura o purpura leve lo que indicaría la producción de AB ya que se genera un ambiente básico.

3.6.2. Determinación de potencial cualitativo de producción de AB por método molecular (Coton y Coton, 2005)

Luego de la extracción del ADN para los diferentes aislamientos tal como ya fue indicado en el presente trabajo se procedió a amplificar por PCR de las siguientes maneras los genes *hdc* y *tyrdc* pertenecientes a histidina descarboxilasa y tirosina descarboxilasa respectivamente:

- 1- Gen *hdc* utilizando el par de cebadores HDC1 (5'-ATGTCAGAGTTTGATAAAAAG-3') y HDC2 (5'-TTAATAATTGATGTTTCCACC-3') para histidina descarboxilasa siguiendo el siguiente programa de amplificación:

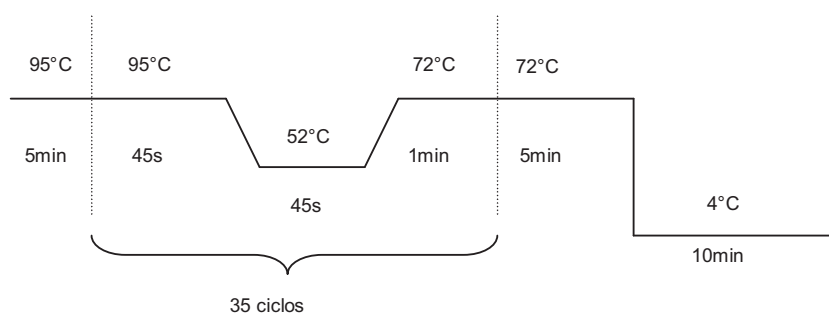


- 2- Detección simultánea (Multiplex) de los genes *hdc* y *tyrdc* combinando 3 sets de cebadores: para *hdc* fue utilizado el par HDC3 (5'-GATGGTATTG TTTCTATGA-3') y HDC4 (5'-CAAACACCAGCATC TTC-3'), para

3. Materiales y Métodos

2014

tyrdc fue utilizado el par TD2 (5'-ACATAGTCAACCATRT TGAA-3') y TD5 (5'-CAAATGGAAGAAGAAGTAGG-3') y como control interno de la PCR se utilizó cebadores universales de 16s ARNr BSF8 (5'-AGAGT TTGAT CCTGGCTCAG-3') y BSR1541 (5'-AAGGAGGTGATCCAGC CGCA-3') de Macrogen. En estos casos fue utilizado en la amplificación Mastermix 2x en la cual se encuentran ya la taq polimerasa y nucleótidos y método convencional donde se prepara una solución con la taq (en nuestro caso Dream taq polimerasa de Fermentas) y nucleótidos de la misma marca. En este caso fue utilizado el ciclo:



Los productos de la amplificación fueron corridos en gel agarosa 0.8% utilizando como marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder Plus de Fermentas.

Se realizaron pruebas de ajuste de las condiciones de multiplex para optimizar su rendimiento. Los ensayos de ajuste de T_m (temperatura de hibridación) en el annealing se lograron a través de un Termociclador de Gradiente CORBETT RESEARCH C61-96 el cual cuenta con la capacidad de amplificación a distintas temperaturas de annealing simultáneamente. Para esta prueba fueron calculadas primeramente a través del programa Primer3plus las T_m para cada primer utilizado y se ensayó a tres T_m distintas la amplificación en forma simultánea 53, 51.2 y 49.

Se realizó PCR multiplex e individualmente para cada par de cebadores en los aislamientos ensayados utilizando el mismo ciclo anterior con una T_m= 49°C.

En todos los casos ensayados fueron utilizadas como control las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 Histidina descarboxilasa – y Tiramina descarboxilasa +, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Histidina descarboxilasa + y Tiramina descarboxilasa + (Kuley y Özogul, 2011).

3. Materiales y Métodos

2014

3.6.3. Método para obtención y cuantificación de AB histamina y tiramina.

En el presente trabajo fueron cuantificadas las AB histamina y tiramina en quesos y medio de cultivo utilizando un método instrumental como HPLC. Se divide el método en dos partes sobre todo en el tratamiento de muestra según sea queso o medio de cultivo (Buňková et al., 2012; Eerola, 1993).

3.6.3.1. Obtención de AB en medios de cultivo.

- a) Para este método primeramente fue preparado un medio de volumen 100 mL de cultivo líquido conteniendo el aminoácido a ensayar histidina o tirosina en una concentración de 2 g/L en el cual fue sembrado 1 mL de una suspensión McFarland 0.5 del aislamiento a ensayar. Estos medios fueron incubados en estufa a 35°C por 96 h.
- b) Fue tomado la totalidad del medio incubado y centrifugado a 3500g, 22°C, 20 min.
- c) Fue diluido el supernadante 1:1 v/v con HClO₄ 0.6 M.
- d) Fue tomado 1 mL de la dilución anterior agregándole en orden 100 µL estándar interno (1,7-heptanediamine, Sigma Aldrich) 400 mg/L, 200 µL NaOH 2N, 300 µL bicarbonato de sodio saturado y por ultimo 2 mL de cloruro de dansilo 10 mg/mL (en acetona).
- e) Fue colocado en baño de agua a 40°C por 45 min.
- f) Fue agregado 100 µL de NH₃ y se colocó 30 min en reposo oscuro.
- g) Terminado el reposo fue ajustado el volumen total a 5 mL con acetonitrilo y se centrifuga este volumen a 2500 rpm por 5 min.
- h) Fue filtrado luego directamente con un filtro de 0.22 micras a pequeños recipientes para HPLC.

3.6.3.2. Obtención de AB histamina y tiramina en quesos

- a) Fueron tomadas primeramente dos fracciones de queso de 5 g cada una.

3. Materiales y Métodos

2014

- b) A cada una de las fracciones anteriores se les agregó 12,5 mL de HClO_4 0.6 M y fueron homogeneizadas con Ultraturax durante 3 min.
- c) Fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min las fracciones homogeneizadas, de las que luego se mezclaron los supernadantes obtenidos completando en caso de necesitar a 25 mL con HClO_4 0.6 M.
- d) Fue tomado 1 mL de los 25 totales del punto c), agregándole en orden 100 μL estándar interno (1,7-heptanediamine, Sigma Aldrich) 400 mg/L, 200 μL NaOH 2 N, 300 μL bicarbonato de sodio saturado y por ultimo 2 mL de cloruro de dansilo 10 mg/mL (en acetona).
- e) Se colocó en baño de agua a 40°C por 45 min.
- f) Fue agregado 100 μL de NH_3 y se colocó 30 min en reposo oscuro.
- g) Terminado el reposo fue ajustado el volumen total a 5mL con acetonitrilo y centrifuga a 2500 rpm por 5 min.
- h) Fue filtrado luego directamente con un filtro de 0.22 micras a pequeños recipientes para HPLC.

3.6.3.3. Cuantificación de AB por HPLC

Para la cuantificación de AB fue utilizado el equipo HPLC Shimadzu Prominence SPD-M20A, Bomba Shimadzu Prominence LC-20AT, Detector UV Shimadzu Prominence SPD-M20A $\lambda=254\text{nm}$, Columna C-18 Phenomenex®. Los patrones de Histamina y Tirosina fueron obtenidos con Sigma Aldrich.

Primeramente fueron obtenidos datos del método tomando en cuenta una curva de bajas concentraciones de los patrones para encontrar un límite de detección, probando también el comportamiento de los patrones. Aquí se obtuvo el límite de detección y fue comprobada la retención de los patrones en relación con el estándar interno.

Las áreas obtenidas de los picos patrones fueron utilizados en el programa estadístico INFOSTAT para lograr una curva de regresión de

3. Materiales y Métodos

2014

la cual obtener las concentraciones de las muestras en cuanto a las AB ensayadas. Para obtener el anterior valor de concentraciones para histamina e tiramina se utiliza el área del pico obtenido y luego se lleva a cabo la regresión en la curva correspondiente $[AB] = f(\text{Área})$. La formación de derivados fluorescentes de los estándares se realizó de la misma manera que las muestras.

Luego de ser inyectados los patrones, las muestras obtenidas en 3.6.3.1. y 3.6.3.2. fueron inyectadas en el HPLC.

La fase móvil utilizada fue un gradiente de elución compuesto por dos solventes: A (acetato de amonio 0.1 M) y B (acetonitrilo). Las condiciones del gradiente de elución fueron: comienzo 80%: 20% de A y B respectivamente, incrementando B a 80% en 25 minutos. La corrida se mantuvo isocráticamente por 5 minutos en las condiciones iniciales. El flujo fue de 0,7 mL/min y el volumen de la inyección fue de 10 μ L.

Las muestras fueron analizadas por duplicado calculando la desviación estándar con la herramienta estadística informática INFOSTAT.

3.7. Proceso de producción de quesos danbo artesanales

En el caso de los quesos artesanales prueba el proceso de producción fue el siguiente (Proporcionado por Proyecto CSIC Tomás López):

a) Reactivos, materiales y equipos:

- Leche cruda
- Ácido láctico
- CaCl_2
- Cuajo
- NaCl
- Agua destilada
- Recipientes estériles
- Recipientes estériles para tomar muestras para estudios microbiológicos
- Tubos de centrifuga 250 mL
- Tela

3. Materiales y Métodos

2014

- Lira estéril
- Material de vidrio estéril
- Papel estéril
- Estufa 30 y 37°C
- pHímetro y buffer calibración
- Refrigeración (baño de agua 12 y 37°C)
- Centrífuga

b) Procedimiento experimental:

- Leche cruda en recipientes estériles transportada bajo refrigeración en menos de 2 h hasta el laboratorio.
- Separar porciones de 250 mL en recipientes estériles.
- Incubar a 25°C por 36 h para el desarrollo de bacterias lácticas presentes en la leche (realizar tomas para análisis microbiológico luego de transcurrido ese tiempo).
- Incorporar cada leche pre-madurada a 250 mL de leche cruda e incubar a 30°C por 10-12 h. Realizar un seguimiento del pH. Realizar también tomas para análisis microbiológico luego de transcurrido ese tiempo.
- Agregado de cuajo y CaCl_2 . Mantener a 30°C por 45 min.
- Cortado de la cuajada con instrumento estéril y calentamiento a 37°C por 15 min.
- Desuerado y 40% suero reemplazado por agua destilada, se centrifuga a 7000xg, 40 min. a temperatura ambiente. Luego mantener en baño de agua a 37°C hasta pH= 5,5. Descartar suero y agregar salmuera (200g NaCl por litro de agua canilla) que se remueve después de 15 minutos. Se sacan los quesos y se secan con papel estéril (condiciones para obtener 55% H, 1,5% sal en el contenido de humedad y pH final cercano a 5)
- Colocación en moldes
- Maduración

3. Materiales y Métodos

2014

Características de los quesos comerciales

En el caso de los danbos comerciales utilizados el identificado como dam es proveniente de industria de pequeña escala en el cual los microorganismos que forman el fermento comercial para producirlo son *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*.

En el caso del segundo queso danbo comercial identificado como dam p, utilizado para comparaciones proveniente de industria de gran escala, los microorganismos que forman el fermento comercial para producirlos son *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*.

Estos quesos son madurados por 20 días y los fermentos comerciales utilizados en cada uno son provenientes de diferentes empresas.

3.8. Comentarios sobre métodos.

El método convencional de producción de acidez o velocidad de acidificación es logrado básicamente a través de la incubación en leche descremada de los cultivos a temperatura óptima de crecimiento durante algunos días por ejemplo 4, tomando a distintos tiempos (cada 2 h las primeras 8 h y luego a las 24, 48, 72 y 96 h) el pH (Franciosi et al., 2011c).

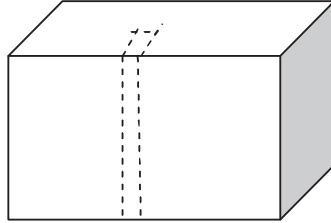
En nuestro caso el método desarrollado en 3.5.1. se comportó satisfactoriamente para la medición del potencial de acidificación.

En cuanto al método molecular 3.6.2., utilizado para verificar la existencia de descarboxilasas se han encontrado trabajos científicos donde se han utilizado otras técnicas como Real Time PCR (Alvarez et al., 2006) así como se han utilizado también otros cebadores como en el caso de los trabajos logrados por Sciancalepore et al. (2013) y Muñoz et al. (2012).

En el caso del muestreo de los quesos utilizados se representó el mismo de forma general, tomando como muestra inicial un corte como se muestra a continuación:

3. Materiales y Métodos

2014



Este corte es homogenizado donde luego son tomadas las cantidades necesarias para cada ensayo.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

4.1. Recuentos de aerobios totales, BAL y coliformes

Tabla 4. Recuentos de microorganismos aerobios totales, BAL mesófilas y termófilas en aerobiosis y anaerobiosis.

MUESTRAS	Aerobios (UFC/mL, UFC/g)	BAL 30 °C Anaerobio (UFC/mL, UFC/g)	BAL 45 °C Anaerobio (UFC/mL, UFC/g)	BAL 30 °C Aerobio (UFC/mL, UFC/g)
Leche Cruda (1er prueba)	1 E+05	2 E+03	1 E+02	
Leche Cruda (2da prueba)	6 E+04	2 E+04	1 E+04	
Leche 12°C-12h	1 E+05	8 E+03	< 1 E+02	
Leche 25°C-36h	4 E+03	1 E+04	2 E+02	1 E+04
Suero-cuajo (1er prueba)	2 E+05	1 E+04	1 E+02	
Suero-cuajo (2da prueba)	1 E+04	9 E+04		
Queso 0 días (1er prueba)	➤ 1 E+07	2 E+07	2 E+06	
Queso madurado 20 días (1er prueba)		➤ 6 E+07	➤ 6 E+07	➤ 6 E+07
Queso madurado 20 días (2da prueba)		➤ 6 E+07	➤ 6 E+07	➤ 6 E+07

En los recuentos se puede ver (Tabla 4) que el número de BAL aumenta de la leche al suero así como también se produce un aumento en el queso y durante la maduración lo cual es esperable. En cuanto al número de aerobios totales se obtienen valores altos.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

Tabla 5. Recuentos de coliformes totales (CT) en quesos artesanales experimentales al avanzar la maduración. (Aportado por Tomás López y Jimena Lázaro).

MUESTRA	COLIFORMES TOTALES (UFC/g)	PROMEDIO (UFC/g)
A1	6 E+07	4 E+07
A1*	2 E+07	
A2	2 E+07	3 E+07
A2*	4 E+07	
A3	2 E+07	1 E+07
A3*	2 E+06	
A4	2 E+06	2 E+06
A4*	2 E+06	
B1	5 E+07	4 E+07
B1*	3 E+07	
B2	1 E+07	9 E+06
B2*	8 E+06	
B3	4 E+06	2.5 E+06
B3*	1 E+06	
B4	1 E+05	1 E+06
B4*	2 E+06	
C1	1 E+07	1 E+07
C1*	1 E+07	
C2	4 E+06	2 E+06
C2*	6 E+03	
C3	2 E+06	2.5 E+06
C3*	3 E+06	
C4	2 E+05	4.6 E+06
C4*	9 E+06	

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

Se encontró una mayor efectividad en el desarrollo de BAL premadurando la leche a 25 °C-36 h, condición utilizada para la elaboración de todos los quesos artesanales utilizados en el presente trabajo.

En la tabla 5 se muestra el número de coliformes totales en los diferentes quesos experimentales al avanzar la maduración en la cual se observa la disminución de coliformes al avanzar la maduración, poco significativa (1 orden) para quesos frescos artesanales a partir de leche cruda, comportándose de la misma manera en cuanto a los recuentos para los dos fermentos utilizados natural, comercial y mezcla de ambos.

4.2. Colonias de BAL obtenidas en recuentos

En las Figuras 11 y 12 se muestran con fotos las características morfológicas de colonias BAL de placas donde fueron seleccionados los diferentes aislados a trabajar.



Fig. 11. Colonias de BAL, medio MRS.

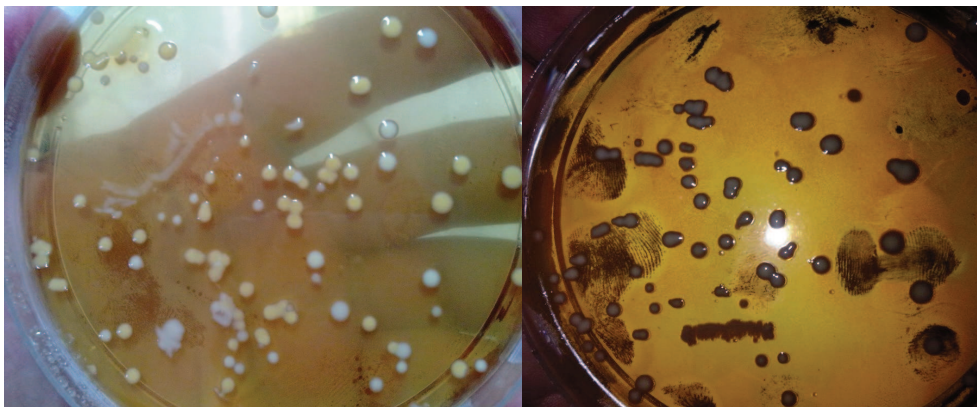


Fig. 12. Colonias de BAL, medio M17.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

4.3. Identificación de aislamientos obtenidos por método test bioquímico.

Los aislamientos de la primer prueba se obtuvieron a partir de muestras de leche, leche madurada 12 h-12 °C, suero-cuajo y queso artesanal 0, 20 días. Estos aislamientos fueron identificados utilizando Kit api® CHL 50 (Figura 13).



Fig. 13. Reconocimiento bioquímico de aislamientos BAL.

Este kit logra el reconocimiento a través de 49 pruebas bioquímicas conteniendo además un blanco como control. Los resultados son cargados en un software el cual se encarga a través de una base de datos del reconocimiento de la cepa.

En la Tabla 6 se presentan los aislamientos obtenidos con sus respectivas tinciones de Gram.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

Tabla 6. Identificación de aislamientos. En el caso de Queso, el mismo cuenta con 0 y 20 días de maduración.

AISLAMIENTO	TINCION DE GRAM	API CHL 50
1b1 (leche) Mesófilo	Coco gram +	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>
1b2 (leche) Mesófilo	Coco gram +	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>
2 (leche) Mesófilo	Bastón gram +	<i>Lactobacillus casei</i>
3a (leche) Mesófilo	Coco gram +	-----
3b (leche) Mesófilo	Bastón gram +	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1</i>
4 (leche) Mesófilo	Bastón gram +	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>
5 (leche) Mesófilo	Bastón gram +	-----
7 (queso 1 ^{er} prueba) Mesófilo 0 días	Coco gram +	<i>Lactococcus lactis spp lactis 2 o 1</i>
10(queso 1 ^{er} prueba) Mesófilo 0 días	Bastón gram +	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>
13(queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 0 días	Coco gram +	<i>Lactococcus lactis spp lactis 1</i>
14(queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 0 días	Coco gram +	<i>Lactococcus lactis spp lactis 1</i>
15(queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 20 días	Coco gram +	<i>Lactococcus lactis spp lactis 1 o 2</i>
16(queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 20 días	Coco gram +	<i>Lactococcus lactis spp lactis 1</i>
17(queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 20 días	Bastón gram +	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

4.4. Identificación de aislamientos obtenidos por método molecular.

La Tabla 7 pertenece a aislamientos de BAL obtenidos del queso experimental de 20 días, se encuentran además aislamientos obtenidos de liofilizado comercial y pertenecientes a quesos primer prueba 0 y 20 días y leche primer prueba como verificación por método molecular.

Tabla 7. Identificación de aislamientos obtenidos de diferentes muestras por método molecular.

Aislamiento	Nombre
G1 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>
G2 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis o faecium</i>
G3 liofilizado	<i>Lactococcus lactis spp lactis</i>
G4 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>
G5 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>
G6 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis</i>
G7 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Escherichia coli</i>
Liof. M17 (liofilizado comercial)	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>
2 (leche)	<i>Lactobacillus casei</i>
3a1 (leche)	-----
7 (queso 0 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis</i>
14 (queso 20 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis</i>
15 (queso 20 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis</i>

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

4.5. Propiedades tecnológicas: acidez, proteólisis y lipolisis.

En cuanto a las propiedades microbiológicas se obtuvieron medidas importantes desde el punto de vista tecnológico como potencial de desarrollo de acidez, proteólisis y lipolisis para los diferentes aislamientos obtenidos.

En la Tabla 8 se encuentra el potencial de desarrollo de acidez para algunos de los aislamientos obtenidos de leche y queso primer prueba con 0 y 20 días de maduración.

Tabla 8. Potencial de desarrollo de acidez para cepas aisladas en leche y queso primer prueba a los 0 y 20 días de maduración.

AISLAMIENTO	NOMBRE	ACIDIFICACION
1b 1 (leche) Mesófilo	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>	alta
1b 2 (leche) Mesófilo	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>	media
3a (leche) Mesófilo	-----	Alta
3b (leche) Mesófilo	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1</i>	-----
4 (leche) Mesófilo	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	Alta
5 (leche) Mesófilo	-----	alta-muy alta
7 (queso 1 ^{er} prueba) Mesófilo 0 días	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>	Media
10 (queso 1 ^{er} prueba) Mesófilo 0 días	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	Baja
13 (queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 0 días	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	-----
14 (queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 20 días	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>	-----
15 (queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 20 días	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	Alta
16 (queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 20 días	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>	-----
17 (queso 1 ^{er} prueba) Termófilo 20 días	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	-----

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

En el caso de la Tabla 9 mostrada a continuación, en esta se puede apreciar el potencial de desarrollo de acidez para las cepas aisladas de queso de la segunda prueba con 20 días de maduración.

Tanto en la Tabla 8 como 9 se muestran en los resultados las diferencias en el potencial de desarrollo de acidez incluso a nivel de subespecie.

Tabla 9. Potencial de desarrollo de acidez en aislamientos obtenidos de diferentes muestras.

Aislamiento	Nombre	Acidez
G1 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	Baja
G2 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis o faecium</i>	Media-baja
G3 liofilizado	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	Media-baja
G4 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>	Alta
G5 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>	Alta
G6 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis</i>	-----
G7 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Escherichia coli</i>	-----
Liof. M17 (liofilizado comercial)	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	Media-baja
3a1 (leche)	-----	Alta
7 (queso 0 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis</i>	Media
14 (queso 20 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis</i>	-----
15 (queso 20 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis</i>	Alta

En las siguientes Tablas 10 y 11 se puede ver el resultado para diferentes aislados con respecto a las propiedades tecnológicas proteólisis y lipólisis que como se puede apreciar no presentan cambios para el tipo de cepas ensayadas siendo proteolíticas y no lipolíticas.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

Tabla 10. Propiedades tecnológicas de interés en aislamientos obtenidos de diferentes muestras.

AISLAMIENTO	NOMBRE	ACTIVIDAD LIPOLITICA	ACTIVIDAD PROTEOLITICA
1b 1 (leche) Mesófilo	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>	-	+
1b 2 (leche) Mesófilo	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>	-	+
2 (leche) Mesófilo	<i>Lactobacillus casei</i>	-	+
3 (leche) Mesófilo	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1</i>	-	+
4 (leche) Mesófilo	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	-	+
7 (queso 0 días 1 ^{er} prueba) Mesófilo	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>	-	+

Tabla 11. Propiedades tecnológicas de interés en aislamientos obtenidos de diferentes muestras de quesos artesanales y liofilizado comercial.

Aislamiento	Nombre	Proteólisis
G1 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	+
G2 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis o faecium</i>	+
G3 liofilizado	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	+
G4 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>	+
G5 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>	+
G6 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis</i>	-----
G7 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Escherichia coli</i>	-----
7 (queso 0 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis</i>	+

En la Figura 14 se muestran fotos de placas donde ha sido ensayado el potencial de acidificación de algunos aislados.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

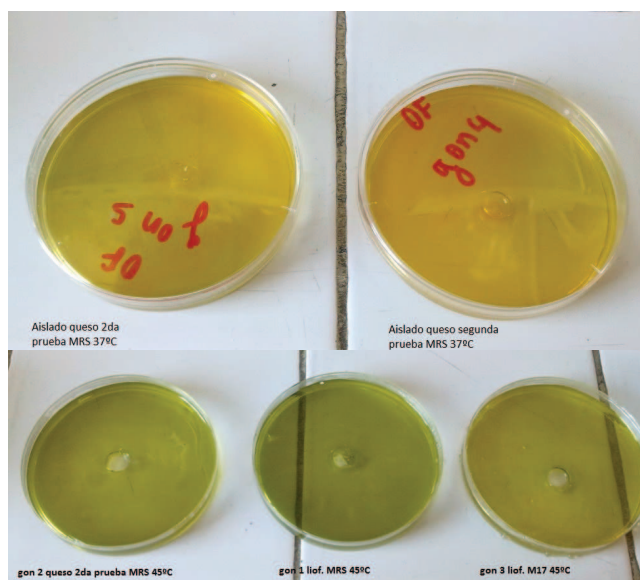


Fig. 14. Ensayo de potencial de acidificación.

Se muestran en el caso del ensayo de propiedades tecnológicas lipólisis y proteólisis las placas obtenidas del mismo en las Figuras 15 y 16 respectivamente.



Fig. 15. Placa de ensayo de Lipólisis - con un aislamiento de BAL obtenido de queso artesanal 1^{er} prueba.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

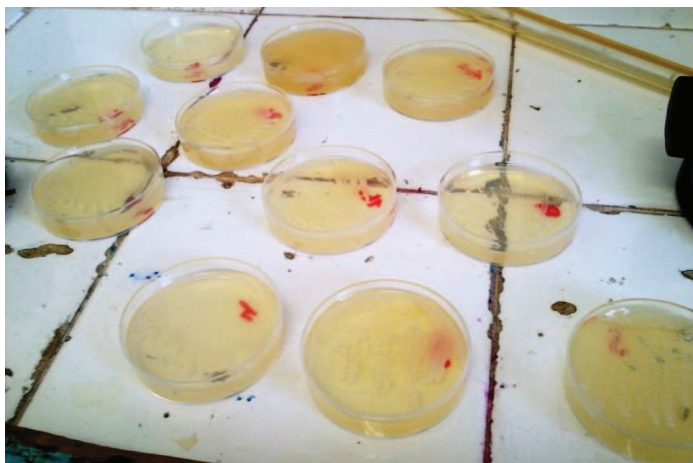


Fig. 16. Placas de ensayo de Proteólisis para diferentes aislamientos.

4.6. Potencial formador de AB por método bioquímico

En las Tablas 12 y 13 se muestra el potencial de formación de AB por descarboxilación de distintos AA ensayados en diferentes aislamientos.

Tabla 12. Potencial formador de AB para diferentes aislamientos de leche cruda.

AA	Aislamiento Nombre	1b2 <i>Lactococcus lactis ssp lactis 2 o 1</i>	2 <i>Lactobacillus casei</i>	3b <i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1</i>	4 <i>Lactobacillus plantarum 1</i>
L-cisteína		-	-	-	-
L-Histidina		+	-	-	-
L-Aspartico		-	-	-	-
L-Ornitina		-	+	-	-
Ac glutámico L-		-	-	-	-
L-lisina		-	-	-	-

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

Tabla 13. Potencial formador de AB para diferentes aislamientos obtenidos de muestras de Quesos artesanales 0, 20 días de maduración

AA	Aislamiento	10	7	15	13	14	16
	Nombre	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Lactococcus lactis</i> spp <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> 1	<i>Lactococcus lactis</i> spp <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> 2 o 1
	L-Alanina	+	+	-	-	-	-
	L-D-Tirosina	-	-	-	-	-	-
	L-Ornitina	-----	+	-	-	-	-
	L-Histidina	-----	-	-	-	-	-

4.7. Potencial formador de AB por método molecular

Las temperaturas de annealing o hibridación (Tm) propuestas por el fabricante fueron comparadas y ajustadas con las obtenidas por el programa primer 3 plus tal como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Temperaturas de hibridación óptimas por primer.

Primer o cebador	Tm proveedor (°C)	Tm primer 3 plus (°C)
HDC 1	51,6	48,9
HDC 2	51,6	52,0
HDC 3	50,2	49,2
HDC 4	50,0	50,0
TD 2	50,2	49,4
TD 5	54,3	51,7
BSF8	58,4	57,0
BSR1541	62,5	67,5

La siguiente Figura 17 muestra los resultados obtenidos a través la de herramienta molecular del ajuste de temperatura de annealing (Tm) para la

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

amplificación de los genes correspondientes a las histidina y tirosina descarboxilasa utilizados en PCR Multiplex.

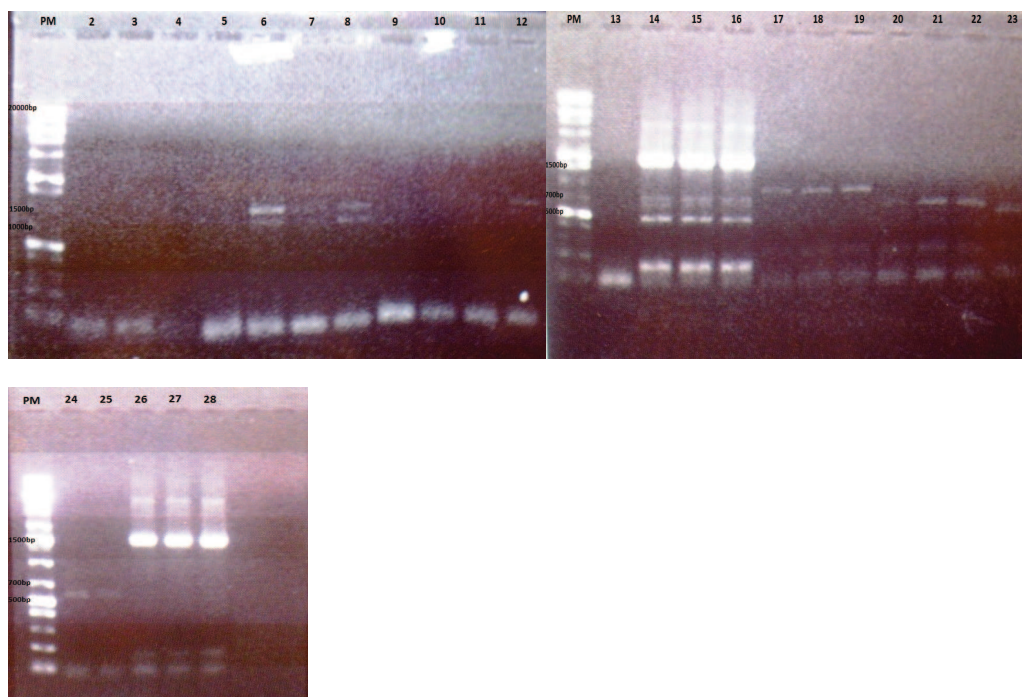


Fig. 17. Ajuste de temperatura de annealing (T_m) para gen 16s ADNr e histidina y tiramina descarboxilasas.

Los resultados obtenidos de la prueba de T_m se muestran en la siguiente Tabla 15.

Esta tabla nos sugiere como la nueva T_m a utilizar 49 °C.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

Tabla 15. Análisis de Tm para los diferentes pares de cebadores a través de termociclador de gradiente. 1, 5, 9 y 13 fueron utilizados como blancos (sin ADN). Ka (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603), Sa (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) fueron utilizados como control.

Cebadores	53 °C	51.2	49 °C	49 °C
HDC1/2 (Ka)	2 (-)	3 (-)	1 (-)	4 (-)
HDC 3/4 (Ka)	6 (-)	7 (-)	5 (-)	8 (-)
TD2/5 (Ka)	10 (-)	11 (-)	9 (-)	12 (+)
BSF8/R1541 (Ka)	14 (+)	15 (+)	13 (-)	16 (+)
HDC 1/2 (Sa)	17 (-)	18 (-)		19 (-)
HDC 3/4 (Sa)	20 (+)	21 (+)		22 (+)
TD2/5 (Sa)	23 (-)	24 (+)		25 (+)
BSF8/R1541 (Ka)	26 (+)	27 (+)		28 (+)

Culminadas las pruebas anteriores se procedió a utilizar Tm= 49°C, siendo esta temperatura la que se ajustaría de forma óptima a la Tm de hibridación de cebadores con ADN.

Los resultados obtenidos a través de herramienta molecular del potencial de formación de histamina y tiramina a través de la amplificación de los genes Histidina descarboxilasa y Tirosina descarboxilasa son mostrados en la siguiente Tabla 16.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

Tabla 16. Potencial formador de AB histamina y tirosina por método molecular.

Aislamiento	Nombre	Histidina des. (mét. molecular)	Tirosina des. (mét. molecular)
G1 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	-	-----
G2 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis o faecium</i>	-	-----
G3 liofilizado	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	-	-
G4 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>	-	-----
G5 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>	-	-
G6 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-----
G7 (queso 20 días segunda prueba)	<i>Escherichia coli</i>	-	+
Liof. M17	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	-	-
2 (leche)	<i>Lactobacillus casei</i>	-	+
3a1 (leche)		-	+
7 (queso 0 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis 2 o 1</i>	-	+
14 (queso 20 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis 1</i>	-	+
15 (queso 20 días primer prueba)	<i>Lactococcus lactis spp lactis 2 o 1</i>	-	+

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

4.8. Cuantificación de AB histamina y tiramina por HPLC

4.8.1. Resultados de la cuantificación de histamina y tiramina en quesos danbo artesanales (A, B y C) y danbo comerciales.

Tabla 17. Cuantificación de tiramina e histamina para quesos frescos artesanales experimentales producidos y comerciales.

Muestra	[Tiramina] (ppm)	[Histamina] (ppm)
A ₁		
A ₂	127,82	59,12
A ₃	142,14	73,05
A ₄	196,81	172,59
B ₁	<15,10	118,30
B ₂		46,40
B ₃		101,31
B ₄	158,12	>314,44
C ₁		11,60
C ₂	>282,80	33,42
C ₃	>282,80	102,02
C ₄	>282,80	136,38
Dam es	N/D	< 15,10
Dam p	< 13,60	32,55

En la Tabla 17 se muestran las concentraciones de tiramina e histamina para los diferentes quesos frescos artesanales prueba, cuantificadas por HPLC. Los valores mostrados en tabla están promediados de los valores obtenidos por duplicado para cada punto (ej. A₁, A₁*) con un desvío estándar (DE) para [Histamina] de 2,67 y 1,41 para la [Tiramina].

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

4.8.2. Resultados de la cuantificación de histamina y tiramina para aislamientos obtenidos de distintas muestras.

Tabla 18. Cuantificación de tiramina e histamina para aislamientos obtenidos de queso artesanal experimental y liofilizado comercial.

Aislamiento	Nombre	[Histamina] (ppm)	[Tiramina] (ppm)
G1(queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	< 30,10	832,33
G2(queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis o faecium</i>	N/D	>2828,00
G3 liofilizado	<i>Lactococcus lactis sub lactis</i>	>3144,40	N/D
G4(queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>	66,03	
G5(queso 20 días segunda prueba)	<i>Lactobacillus casei</i>	> 3144,40	1249,05
G6(queso 20 días segunda prueba)	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 3144,40	831,01
G7(queso 20 días segunda prueba)	<i>Escherichia coli</i>	64,83	

En la Tabla 18 se muestran las concentraciones de tiramina e histamina para los diferentes aislamientos ensayados, cuantificados por HPLC. Los valores mostrados en tabla están promediados de los valores obtenidos por duplicado para cada punto con un desvío estándar (DE) para [Histamina] de 7,76 y 29,18 para la [Tiramina].

4.8.3 Características de metodología HPLC

En la siguiente Figura 18 se muestran los picos obtenidos en este caso para un patrón en donde el primer pico alrededor de un tiempo (t) $\approx$ 2,5 min. para Histamina, t $\approx$ 3,5 min. para Estándar Interno (segundo pico) y un pico en t $\approx$ 6,0 min. para Tiramina.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

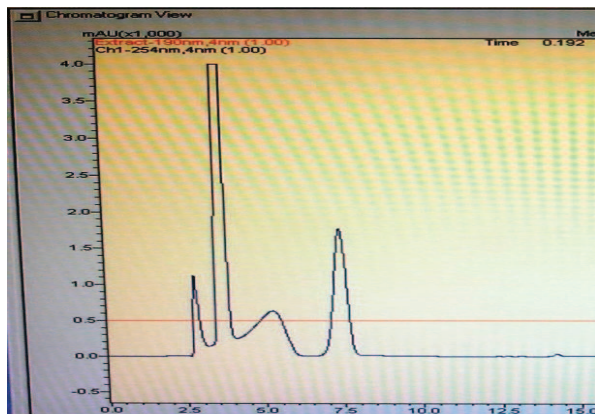


Fig 18. Tiempos de retención para picos de histamina, Estándar Interno y tiramina obtenidos con HPLC.

Las curvas de regresión obtenidas con los estándares utilizados para obtener las concentraciones problema fueron las siguientes:

Histamina $\implies$ $[HIS] \text{ (ppm)} = -1,41 + 1,12 \exp-5 \text{ Área} \quad r^2 = 0,94 \text{ (1)}$

$$[HIS] \text{ (ppm)} = -122,56 + 2,45 \exp-3 \text{ Área} \quad r^2 = 0,98 \text{ (2)}$$

RANGO: 30,10 – 314,44 ppm

Tiramina $\implies$ $[Tyr] \text{ (ppm)} = -331,38 + 2,54 \exp-5 \text{ Área} \quad r^2 = 0,99 \text{ (1)}$

$$[Tyr] \text{ (ppm)} = -10,02 + 1,64 \exp-5 \text{ Área} \quad r^2 = 0,97 \text{ (2)}$$

RANGOS: 27,25 – 1132,52 ppm y 27,25 – 282,80 ppm

Las medidas fueron generadas en dos etapas primera etapa (1) y segunda etapa (2).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

4.9. Discusión de resultados

Los recuentos muestran en cuanto a los números obtenidos una variabilidad en la materia prima leche cruda para mesófilos aerobios en las dos diferentes pruebas (1^{era} prueba y 2^{da} prueba) lo cual es de esperar en estos tambos donde la calidad microbiológica es variante.

En el caso de la premaduración de la leche cruda a 25°C por 36 h esta fue la que se seleccionó para desarrollar los quesos artesanales dado que el desarrollo de BAL en estas condiciones fue optima y la disminución de aerobios es mayor comparado por ejemplo con condiciones de premaduración como 12 °C.

El comportamiento del recuento de BAL sigue el mismo patrón general manteniendo su orden para las leches maduradas y suero-cuajo, aumentando considerablemente en el queso 0 días y 20 días de maduración.

En el caso del recuento de coliformes totales (CT), estos mostraron un orden igual en los quesos artesanales preparados, notando una disminución en todos los casos del recuento en un orden con el transcurso de la maduración.

Para la identificación de BAL se reconocieron primeramente sus características morfológicas, seguido por una tinción de Gram. Estas fueron finalmente identificadas por métodos bioquímicos y moleculares. Fueron encontradas diferentes cepas BAL como *Lactococcus lactis* perteneciente al género Lactococci, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* perteneciente al género Lactobacillus, tal como se ha visto en trabajos consultados (Lacroix et al., 2013; Loizzo et al., 2013).

Otras cepas aisladas no BAL fueron las pertenecientes a las especies *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, tal como se ha visto en trabajos consultados. (Lacroix et al., 2013; Loizzo et al., 2013).

En cuanto a la propiedad tecnológica potencial de acidificación se encontró variabilidad dentro de los aislamientos ensayados para esta propiedad a nivel de especie e incluso sub-especie.

Para la propiedad tecnológica proteólisis se encuentra que las BAL ensayadas fueron positivas. En el caso de *Enterococcus* estos mostraron ser también proteolíticos.

En cuanto a la propiedad tecnológica lipólisis se encuentra que los aislamientos de BAL ensayados fueron negativos.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

2014

Los ensayos de potencial formador de AB mostraron variabilidad incluso a nivel de subespecie.

En el caso del método de cuantificación por HPLC se encontraron niveles de HIS e TYR en los quesos frescos dambo comerciales y producidos artesanales en laboratorio muy diferentes entre sí entre comerciales y entre los producidos artesanales.

Los niveles cuantificados por HPLC de HIS e TYR son en la mayor parte comparables con los obtenidos en los trabajos con quesos extranjeros como el Pecorino y otros que se han realizado siendo en algunos casos las concentraciones menores (Mayer et al., 2010; Mayer et al., 2013; Schirone et al., 2013; Suzzi et al., 2011). Casos a citar como ejemplo son Austrian Edam Cheese con 3,2 ppm para HIS y queso Tiroler Almkäse, PDO con 1159,7 ppm para HIS e 475,2 ppm para TYR (Mayer et al., 2010). En el caso de queso Pecorino se han encontrado valores para HIS de 4,1-21,8 ppm y 52,3-1171.3 ppm de TYR (Schirone et al., 2013; Suzzi et al., 2011).

En cuanto a la cuantificación de las dos AB utilizadas HIS e TYR para los aislamientos obtenidos se puede ver claramente que incluso a nivel de subespecie estos son capaces de generar concentraciones muy diferentes.

De los resultados de cuantificación de AB por HPLC se pudo ver que con el aumento del tiempo de maduración del queso aumenta la concentración de las AB ensayadas HIS e TYR en los quesos con lo que aumenta entonces el riesgo de intoxicación.

Un punto importante además de diferencias en las concentraciones de las AB ensayadas HIS y TYR para los aislamientos de BAL (en donde algunos de ellos generan concentraciones muy bajas), es que los mismos son capaces en el tiempo al ir aumentando su biomasa y generar mayor acidez de disminuir el recuento de enterobacterias como coliformes totales y posiblemente patógenos como se evidencia en la tabla de recuentos de coliformes totales de quesos artesanales prueba.

5. CONCLUSION Y PERSPECTIVAS

2014

5.1. Conclusiones

Los ensayos de potencial toxigenico respecto a la acumulación de aminas biógenas para los diferentes aislamientos y quesos artesanales e industriales mostraron una gran variabilidad.

Los aislamientos incluso a nivel de sub especie mostraron una alta variabilidad en propiedades tecnológicas y generación de aminas biógenas por lo que a través de lo expuesto en este trabajo, los microorganismos son el principal factor de generación de aminas biógenas.

Al aumentar la complejidad microbiológica de los starters, se encuentra mayor desarrollo de aminas biógenas como histamina y tiramina.

La acumulación de aminas biógenas como histamina y tiramina aumentan con el tiempo de maduración o estacionamiento del queso fresco danbo.

Los starters comerciales mostraron diferencias entre sí en cuanto a las concentraciones de histamina o tiramina generada, en el starter más simple no fue detectada tiramina y la histamina estuvo por debajo del límite planteado por la curva de calibración, mientras que con el starter comercial un poco más complejo en composición microbiológica la tiramina se encontró por debajo del límite planteado y la histamina en un bajo valor de 32, 55 µg/g.

Diferencias más importantes fueron encontradas en los quesos frescos artesanales producidos A, B y C los cuales obviamente por su naturaleza son más complejos microbiológicamente. Estos últimos generaron mayores cantidades de aminas biógenas histamina y tiramina.

Visto el desarrollo de aminas biógenas tanto en quesos desarrollados como comerciales y por las diferentes cepas aisladas, podemos decir que es entonces importante controlar el factor microbiológico para llegar a productos finales por medio de fermentación como quesos con una mínima o nula acumulación de aminas biógenas, pudiendo seleccionar cepas de BAL capaces de generar cantidades mínimas o ínfimas de estas. Cumpliendo las recomendaciones por parte de organismos internacionales como FAO y WHO los cuales indican que no se debe sobrepasar el límite de 1000 mg/kg de aminas biógenas.

Existe entonces la posibilidad de seleccionar cepas cuyo potencial de acidificación sea alto, siendo además proteolíticas con una baja o nula capacidad de producción de aminas biógenas como histamina y tirosina.

5. CONCLUSION Y PERSPECTIVAS

2014

5.2. Perspectivas

En cuanto a las perspectivas se podrían hacer planteos en lo que se refiere a metodología, legislación, proceso y trabajo de investigación.

Al tener en cuenta las metodologías podemos decir que hay una superioridad de la metodología de análisis instrumental HPLC comparada con el método bioquímico o molecular de forma de obtener una acertada visión toxicológica ya que se cuantifican concentraciones para los distintos ensayos con un mínimo error para las bajas cantidades en las que se encuentran las AB.

En cuanto al método molecular para verificar el potencial de producción de AB en cepas, este si bien funciona se han encontrado problemas en cuanto a la amplificación del gen *hdc* el cual debe continuar en estudio (por ej. la opción de utilizar otro tipo de cebador). Debe ser ajustado en el método molecular el funcionamiento de multiplex PCR para amplificar los genes histidina y tirosina descarboxilasa, sumando además phe descarboxilasa ya que las aminas biógenas propuestas en diferentes trabajos como "mayormente peligrosas" son histamina, tiramina y feniletilamina.

Es importante tener en cuenta métodos los cuales si bien no se han podido llevar a cabo son una línea importante de investigación ya que es de vital importancia su ajuste y mejora continua, dentro de estos métodos encontramos cromatografía en capa fina, cromatografía gaseosa, cromatografía líquida y métodos electroforéticos capilares (Spizzirri et al., 2013). Un método en continuo desarrollo es también una cromatografía líquida con detección electroquímica como las técnicas de cromatografía líquida de ultra presión (UPLC) (Spizzirri et al., 2013) o ultra alta presión (UHPLC) (Mayer et al., 2013).

Los métodos moleculares para determinación ya sea del potencial o cuantificación de AB se encuentran también en un avance continuo dentro de los cuales se encontraron Multiplex PCR (Sciancalepore et al., 2013), real time PCR cuantitativa (Alvarez et al., 2006; Schirone et al., 2013).

En cuanto a la legislación esta se muestra demasiado escueta en este tema ya que lo visto se ocupa básicamente del planteo de un límite general máximo de 1000 mg/kg de AB y siendo específica en el caso solo del pescado el cual no debe sobrepasar los 100 mg/kg para el caso de la histamina. Sería interesante entonces rever y plantear límites y/o condiciones para los casos mínimos de histamina y tiramina las cuales se encuentran mayormente, siendo las más preocupantes junto con feniletilamina.

5. CONCLUSION Y PERSPECTIVAS

2014

Sería importante el utilizar cepas BAL seleccionadas por su bajo producción en cuanto a AB (histamina y tiramina en este caso) y un adecuado potencial tecnológico (alto potencial de acidificación y proteolíticas) obtenidas del screening para la producción de quesos, ya sea por separado o en conjunto convenientemente de forma de terminar de verificar la potencialidad toxicológica en el producto final.

6.REFERENCIAS

2014

Alais Charles. (1985). Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Editorial Reverté S.A., Barcelona.

Alvarez M. A., Fernández M., del Río B., Linares D. M., Martín M. C.. (2006). Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production. Journal Dairy Science. 89, 3763-3769.

Alvarez M. A., Herrero-Fresno A., Martínez N., Sánchez-Llana E., Díaz M., Fernández M., Martín M. C., Ladero V.. (2012). *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. International Journal of Food Microbiology 157, 297-304.

Bover-Cid Sara, Latorre-Moratalla M. Luz, Garriga Margarita, Vidal-Carou M. Carmen (2005). Aminas biógenas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control. Eurocarne Noviembre 2005 N° 141.

Buňková L., Lorencová E., Matoulková D., Drab 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.

Chacón J.. (2012). Moléculas que originan los sabores y aromas en la leche, los quesos y los vinos. Escuela de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

Contreras M., Izquierdo P., Allara M., García A., Torres G., Céspedes E.. (2007). Biogenic Amines Determination in Ripened Cheeses. Revista Científica, FCV-LUZ/ Vol XVII, N°1, 89-95.

Coton E., Coton M.. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine – and tyramine – producing bacteria. Journal of Microbiological Methods 63, 296-304.

Eerola S.. (1993). Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Dry Sausages. Journal of AOAC International 76, N° 3.

Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Dworkin M., Stackebrandt E.. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. 2006.

Fernández María, Álvarez Miguel A. (2005). Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC).

Fox P., McSweeney P., Cogan T., Guinee T.. (2004). Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Third Edition. Volume 1 General Aspects.

6.REFERENCIAS

2014

Franciosi E., De Sabbata G., Gardini F., Cavazza A., Poznanski. (2011). Changes in psychrotrophic microbial populations during milk creaming to produce Grana Trentino cheese. *Food Microbiology* 28, 43-51.

Franciosi E., Monfredini L., Settanni L., Poznanski E., Cavazza A.. (2011) b. The spacial distribution of bacteria in Grana-cheese during ripening. *Systematic and Applied Microbiology* 35, 54-63.

Franciosi E., Settanni L., Cavazza A., Cocconcelli P.S., Poznanski E.. (2011) c. Extension of Toséla cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 28, 883-890.

Gardini F., Suzzi G.. (2003). Biogenic Amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* 88, 41-54.

Gardini F., Bover-Cid S., Torriani S., Gatto V., Tofalo R., Suzzi G., Belletti N.. (2008). Relationships between microbial population dynamics and putrescine and Cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Ghanbari M., Jami M., Doming K. J., Kneifel W.. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria- A review. *LWT- Food Science and Technology* 54, 315-324.

ICMSF. Microorganismos de los alimentos 2, métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y Aplicaciones específicas. 2^{da} Edición. Editorial ACRIBIA, SA. ZARAGOZA (España) 1999.

Informe comunitario sobre brotes de toxiinfecciones alimentarias en la Unión Europea de 2007. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria.

Junega V. K., Sofos J. N.(2010). *Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions*. Edited by V. K. Junega and J. N. Sofos. © 2010 ASM Press, Washington, DC.

Khalid K.. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*. Vol. 1, No. 3, p. 1-13

Kuley E., Özogul F.. (2011). Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chemistry* 127, 1163-1168.

Křížek M., Dadáková E., Pelikánová T.. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry* 116, 365-370.

6.REFERENCIAS

2014

Lacroix C., Saxer S., Schwenninger S. M..(2013). Characterization of the microflora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives. LWT-Food Science and Technology 53, 314-320.

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

Londvaud-Funel A., Moreno Arribas V., Torlois S., Joyeux A., Bertrand A.. (2000). Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. Journal of Applied Microbiology 88, 584-593.

Lund F., Filtenborg O., Frisvad J. C.. (1995). Associated mycoflora of cheese. Food Microbiology 12, 173-180.

Lyte M.. (2004). The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa. Journal Of Food Protection 6, 878-883.

Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J. C., Soulas G., Catroux G.. (2001). DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbiological Diversity Analisis Methods. Applied and Enviromental Microbiology May 2001, 2354-2359.

Martín A., Ruiz-Moyano S., Benito M. J., Casquete R., Serradilla M. J., Córdoba M.. (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. Meat Science 83, 460-467.

Mayer H. K., Fiechter G., Fischer E.. (2010). A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. Journal of Chromatography A 1217, 3251-3257.

Mayer H. K., Fiechter G., Sivec G.. (2013). Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. Journal of Chromatography B 927, 191-200.

Moreno-Arribas M. V.. (2007). Control de la formación de aminas biógenas durante la elaboración y crianza del vino. Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC. España.

Muñoz R., Fadhlouzi-Zid K., Curiel J. A., Landeta G., Fattouch S., Reverón I., de las Rivas B., Sadok S.. (2012). Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel. Food Control 25, 89-95.

6.REFERENCIAS

2014

Muñoz R., Landete J. M., de las Rivas B., Marcobal A.. (2007). Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology* 117, 258-269.

Muñoz R., Moreno-Arribas M. V., Polo M. C., Jorganes F.. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 84, 117-123.

Önal A., Kepekci Tekkeli S. E., Önal C.. (2013). A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* 138, 509-515.

Panizza P.. (2013). Evaluación y optimización de las propiedades bioquímicas, genéticas y moleculares de las lipasas de pseudomonas y prospección de nuevas enzimas lipolíticas para biocatálisis. Tesis Doctoral. Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Panizzolo L.A., Araújo A.C., Taroco L.V., Rodríguez A., Schöpf G.. (2011). Evolución de la proteólisis durante la maduración de quesos danbo elaborados con distintos cultivos iniciadores. *INNOTECH-N° 6-2011*

Reglamento Bromatológico Nacional, Decreto 315/94.

Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

Salminen S., von Wright A., Ouwehand A.. (2004). *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. Third Edition 2004, Copyright © by Marcel Dekker, Inc.

Schirone M., Tofalo R., Fasoli G., Perpetuini G., Corsetti A., Manetta A. C., Ciarrocchi A., Suzzi G.. (2013). High content of biogenic amines in Pecorino cheeses. *Food Microbiology* 34, 137-144.

Sciancalepore A. G., Mele E., Arcadio V., Reddavid F.. (2013). Microdroplet-based multiplex PCR on chip to detect foodborne bacteria producing biogenic amines. *Food Microbiology* 35, 10-14.

Settanni L., Franciosi E., Cavazza A., Poznanski E.. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *International Dairy Journal* 19, 3-11.

Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29:675-690.

6.REFERENCIAS

2014

Smělá D., Pechová P., Komprda T., Klejdus B., Kubáň V.. (2004). Chromatografické Stanovení Biogenních Aminů V Trvanlivých Salámech Během Fermentace A Skladování. Chem. Listy 98, 432-437.

Spano G., Russo P., Lonvaud-Funel A., Lucas P., Alexandre H., Grandvalet C., Coton E., Coton M., Barnavon L., Bach B., Rattray F., Bunte A., Magni C., Ladero V., Alvarez M.. (2010). Biogenic amines in fermented foods. European Journal of Clinical Nutrition 64, S95-S100.

Spizzirri U. G., Restuccia D., Curcio M., Parisi O. I., Iemma F., Picci N.. (2013). Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. Journal of Food Composition and Analysis 29, 43-51.

Suzzi G., Schirone M., Tofalo R., Mazzone G., Corsetti A.. (2011). Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. Food Microbiology 28, 128-136.

Tuncer Y.. (2009). Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish Tulum cheese. African Journal of Biotechnology vol. 8 (24), 7008-7016.

www.codexalimentarius.org

www.inti.gov.ar

ANEXO 1

Review

Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese

Monica Rosa Loizzo, Francesco Menichini, Nevio Picci, Francesco Puoci, Umile Gianfranco Spizzirri and Donatella Restuccia*

Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Nutrition and Health Sciences, University of Calabria, 87036 Rende (CS), Italy (e-mail: donatella.restuccia@unical.it)

Biogenic amines (BAs) are detrimental to health and the consumption of food containing high concentrations of these compounds may cause toxic reactions. In particular, cases of tyramine intoxication have occurred subsequent to the consumption of cheese and the term “cheese reaction” has been coined to refer to it. The main pre-requisites for the presence of BAs in foods include: availability of free amino acids, the presence of microorganisms producing BA enzymes (mainly from raw materials and/or added starter cultures), conditions allowing their growth (particularly temperature, pH), as well as conditions affecting the enzyme production and activity (particularly low pH). The main technological aspects affecting aminogenesis in cheese are the presence of micro-organisms, their proteolytic and decarboxylase activities, ripening time, ripening temperature, pH and NaCl concentration. Moreover

secondary parameters such as post-ripening processes and packaging can affect the accumulation of BAs as well. High temperature, high pH, low salt content, prolonged ageing and air packaging seem to accelerate the amino acid accumulation while the effect of grating seem to be mostly related with microbiological contamination, both aspects supporting the BAs increase.

Introduction

Milk and milk products are very important in human nutrition and, among them, cheese is considered a good source proteins, vitamins and minerals. However, cheese is one of the most fermented food commonly associated with BAs contamination. These compounds are basic nitrogenous compounds formed by a series of microorganism, mainly by decarboxylation of amino acids or “*in vivo*” also by amination and transamination of aldehydes and ketones. The most important BAs found in food are histamine (HIS), tyramine (TYR), putrescine (PUT), cadaverine (CAD) and phenylethylamine (PHE), which are products of the decarboxylation of histidine, tyrosine, ornithine, lysine and phenylalanine, respectively. PUT can also be formed through deamination of agmatine (AGM) (Fig. 1). BAs can be classified as aromatic amines (HIS, TYR, serotonin (SER), PHE, and tryptamine (TRP)), aliphatic diamines (PUT and CAD), and aliphatic polyamines (AGM, spermidine (SPD) and spermine (SPM)). On the basis of their chemical structure, BAs be classified as aliphatic (PUT and CAD), heterocyclic (HIS and TRP), aromatic (TYR and PHE), while, according to their number of amine groups they can be divided into monoamines (TYR and PHE) and diamines (HIS, PUT and CAD). Bardócz (1995) classified BAs as “natural polyamines” and “biogenic amines,” depending on the biosynthetic pathway (Fig. 2).

The primary relevance of BAs is that intake of fermented foods or beverages containing high concentrations of these compounds can present a health hazard through their toxic effect. Moreover they may also have a role as indicators of quality and/or acceptability in some foods (Bardócz, 1995; Silla Santos, 1996).

The severity of clinical symptoms related to BAs intoxication depends on the amount and type of BA ingested and the correct functioning of the detoxification system. This last aspect could be influenced by human susceptibility,

* Corresponding author.

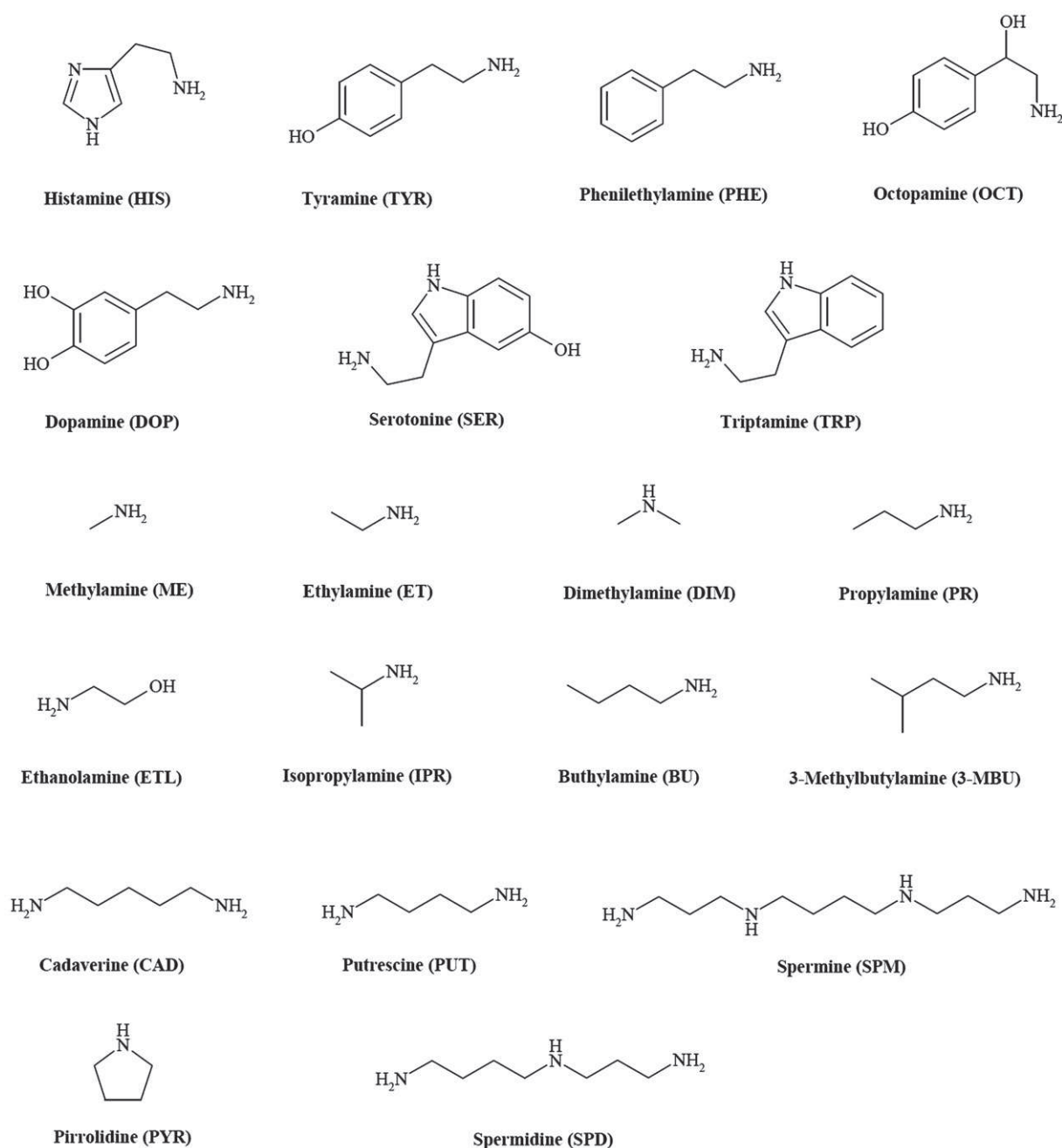


Fig. 1. Chemical structure of the biogenic amines.

genetic disorder, smoking, contemporary consumption of medication (MAO inhibitors, in particular) or BAs rich food or beverage. “Scombroid poisoning” it is caused by HIS. The clinical signs normally appear between 30 min to a few hours after BAs ingestion and generally disappear within 24 h; it is characterized by headaches, vertigo, nausea and vomiting, enhancing of secretion by gastric mucosa, gastrointestinal cramps, stomach ache and diarrhoea, hypotension, tachycardia, extrasystoles, itching, nose congestion, rhinorrhoea, blepharitis, flush, pruritus and urticaria (Amon *et al.*, 1999). On the other hand,

“Cheese reaction” is related with TYR which is particularly abundant in aged cheese (Shalaby, 1996). It’s characterized by a release of catecholamines from the sympathetic nervous system and the adrenal medulla, both causing an increase of the mean arterial blood pressure ($\geq 180/120$ mmHg) and heart rate by peripheral vasoconstriction, producing hypertensive crisis as more dangerous consequence.

Cheese is an ideal substrate for the amine production as its manufacturing process involves the availability of free amino acids as an outcome of proteolysis levels, the

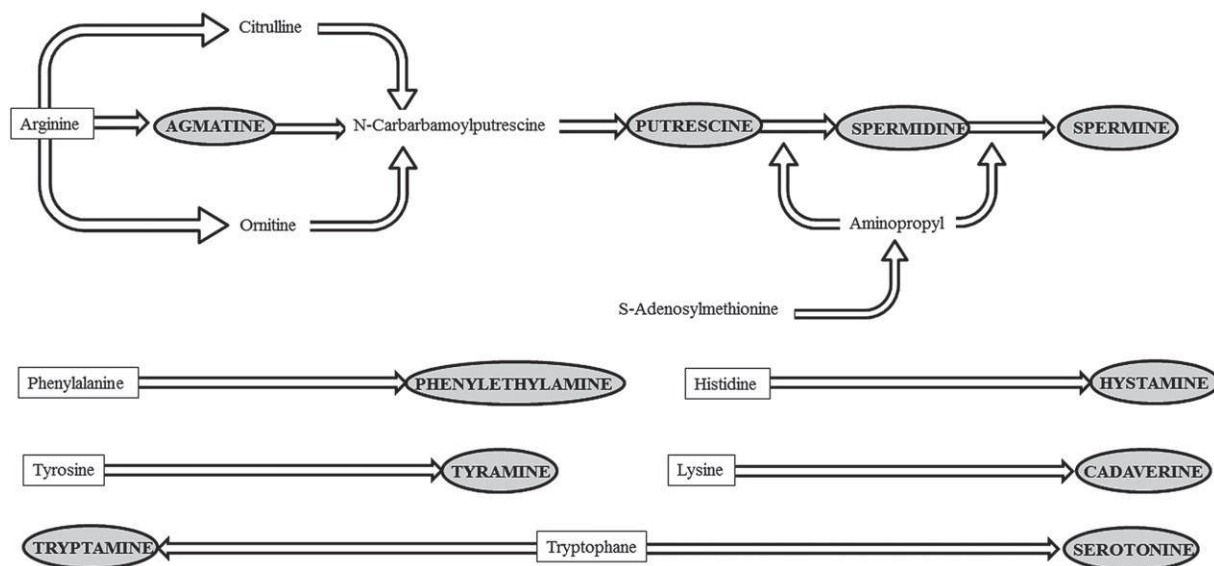


Fig. 2. Generation of biogenic amines.

possible presence of decarboxylase-positive microorganisms and the environmental conditions that allow their growth as well as the presence of suitable cofactors (pyridoxal phosphate) (Stratton, Hutkin, & Taylor, 1991). Other factors affecting the production of BAs in cheeses include the presence of spoiling microorganisms and the synergistic effects between microorganisms. Moreover several extrinsic factors may also play an important role, namely, pasteurization of milk, salt-in-moisture levels and ripening time (Linares, Martín, Ladero, Álvarez, & Fernández, 2011). It follows that the reasons for the determination of BAs in foods are two-fold: first their potential toxicity; second the possibility of using them as food quality markers as their concentration can be related with the hygienic-sanitary quality of the process and with the freshness of the raw materials and the processed products (Ten Brink, Damink, Joosten, & Huisin't Veld, 1990).

Herein we report a comprehensive and critical work on the technological parameters affecting BAs accumulation during preparation and storage of cheese. The possible analytical techniques (chromatographic and molecular methods) useful for BAs determination in foods are also reported. In particular, results obtained during the last five years will be discussed in detail.

Recent advances in the BAs determination in cheese

Detection of BAs is important as part of investigating incidents of potential food poisoning, for verification of the food production processes (including HACCP) and as a measure of quality (freshness) of both raw materials and finished products. The methods commonly used in the quantification of BAs can be divided into two groups: those based on the detection of BAs themselves

(Table 1), and those based on the detection of the producer microorganisms (Önal, 2007).

Methods used for amine determination involve extraction, purification and analytical determination. There is still no consensus on which solvent is the most appropriate for the extraction of amines from cheese prior analysis. The efficiency of chloridric, trichloroacetic, perchloric, sulfosalicylic and acetic acid, borate buffer, methanol and ethanol in the extraction of ten BAs from grated Parmesan cheese was investigated by Custodio, Tavares, and Abreu (2007). None of the solvents extracted efficiently all of the amines; moreover, each solvent provided different recovery values for the various groups of amines, probably because of the different partition coefficients and solubilities of the amines in the extraction media. Authors concluded that HCl would be the best amine solvent for grated cheese, extracting seven of the ten amines. However, when selective extraction of some amines is desired, different solvents should be used in order to optimize recovery of the amine of interest.

The analytical methods used for quantification of BAs are mainly based on chromatographic methods, HPLC being the most exploited due to low volatility and lack of chromophores of most Bas. The large majority of assays employs fluorimetric and UV-detection with precolumn or postcolumn derivatization techniques with different derivatizing agents (Önal, 2007). In this regards, the extracts previously obtained by Custodio *et al.* (2007) were analysed for bioactive amines according to the procedure described by Vale and Glória (1997). The amines were separated by ion-pair HPLC and quantified spectrofluorimetrically after post-column derivatization with o-phthalaldehyde.

As BAs derive from amino acids, sensitive methods for the simultaneous detection of both classes of compounds

Table 1. Recent advanced in the determination of BAs by chromatographic methods.

Biogenic amines	Sample	Extraction procedure	Separation/detection	Derivatization	References
SPM, SPD, AGM, PUT, CAD, HIS, TYR, PHE, TRP, SER	Grated Parmesan	a) 1.0 g of sample with 15 mL of acid (HCl 0.1 or 1 M, 12% sulfosalicylic acid, 5% trichloroacetic acid, 0.4 M HClO ₄ , 15% acetic acid) b) 1.0 g of sample with 15 mL of borate buffer (pH 10.2) c) 4.0 g of sample with 20 mL of methanol d) 2.0 g of sample with 7 mL of methanol (three times) e) 2.0 g of sample with 7 mL of methanol + 1 mL HCl 0.1 N f) 2.0 g of sample with 7 mL of ethanol (three times) at r.t. g) 4.0 g of sample with 20 mL of hot ethanol h) 1.0 g of sample with 15 mL of acid	Ion-pair HPLC system with a RP μ Bondapak C ₁₈ column/fluorimetric detector at 340 and 445 nm of excitation and emission (LOD = NR; LOQ = NR)	Post-column derivatization with o-phthalaldehyde	Custodio et al., 2007
TYR, HIS, PUT, CAD, PHE, SPD, SPM, TRP	Semi-hard Italian cheese	10 g of sample with 20 mL of HCl 0.1 N	HPLC system with a RP Kromasil KR 100-5 C ₁₈ /UV detector set at 254 nm (LOD = NR; LOQ = NR)	Precolumn derivatization with dansyl chloride	Innocente et al., 2002
HIS, TRP, CAD, TYR, +amino acids precursor	Hungary cheeses	0.2 g of cheese with 2.0 mL of acid solution (1 M HClO ₄ , 1 M HCl, 1 M Cl ₃ CCOOH and 0.5 M sulfosalicylic acid)	HPLC system with a Thermo Hypersil (5 μ m), 250 mm $\times$ 4.6 mm + 20 mm $\times$ 4 μ m guard column/Diode array detection simultaneous to fluorescence detection (LOD = NR; LOQ = NR)	Postcolumn derivatization with o-phthalaldehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate	Kőrös, Varga, & Molnar-Perl, 2008
HIS, TYR, TRP, AGM, PHE, SPD, SPM, CAD, PUT + amino acids precursor	Cheeses, salami and beer	5.0 g with 25.0 mL of 0.10 M HCl	HPLC system with a LiChrospher C ₁₈ (250 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m) column equipped with a C ₁₈ precolumn (15 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m)/UV detector set at 254 nm (LOD = 17–67 μ g L ⁻¹ ; LOQ = 45–229 μ g L ⁻¹)	Precolumn derivatization with dansyl chloride	Mazzucco et al., 2010
HIS, TYR, PUT, PHE, SPD, SPM	Calabria (South Italy) ripened cheese	5.0 g of sample with 25.0 mL of 0.10 M HCl	HPLC system with a Primsep 200 column with Primsep 200 Guard Kit (10 mm $\times$ 4.6 mm I.D., 5 μ m)/Evaporative light scattering detector (LOD = 1.9–3.6 mg L ⁻¹ ; LOQ = 3.6–9.3 mg L ⁻¹)	None	Restuccia et al., 2011

(continued on next page)

Table 1. (continued)

Biogenic amines	Sample	Extraction procedure	Separation/detection	Derivatization	References
TYR, HIS, CAD, SPD, SPM, TRP	Piedmont (North-West Italy) cheeses	5.0 g of sample with 25.0 mL of 0.10 M HCl	HPLC system with a Luna C ₁₈ column (150 mm × 2.00 mm, 3 µm, equipped with a precolumn Security Guard Cartridge (4.0 mm × 2.0 mm)/Thermoquest LCQ Duo ion trap mass spectrometer equipped with an ESI ion source (LOD = 1.7–22.5 µg L ⁻¹ ; LOQ = 5.6–68.2 µg L ⁻¹)	None	Gosetti et al., 2007
CAD, HIS, SPD, SPM, TRP, TYR, PUT	Castelmagno cheese (North-West Italy)	5.0 g of sample with 25.0 mL of 0.10 M HCl	HPLC system with an Atlantis HILIC column (150.0 mm × 2.1 mm i.d., 3 µm)/Thermoquest LCQ Duo ion trap mass spectrometer equipped with both TIS and APCI ion source (LOD = 1.0–3.5 µg L ⁻¹ ; LOQ = 3.0–10.0 µg L ⁻¹)	None	Giannotti et al., 2008
PUT, HIS, TYR, TPR, PHE, SPD, CAD + amino acids precursor	Cheese	2.0 g with 20.0 mL of 0.10 M HCl	UPLC system with a Acquity TM column (BEH C ₁₈ , 1.7 µm; 2.1 mm × 100 mm)/MicroTOF-Q II mass spectrometer equipped with an ESI ion source (LOD = 0.02–0.05 mg L ⁻¹ ; LOQ = 0.005–0.02 mg L ⁻¹)	Precolumn derivatization with dansyl chloride	Jia et al., 2011
HIS, TYR, PHE, SER, TPR, OCP, DOP, CAD, PUT, AGM, SPM, SPD	Semi-ripened cheese	10 g of sample with 9 mL of 0.6 N HClO ₄	UHPLC system with a UPLC BEH C ₁₈ 1.7 µm column (2.1 mm × 50 mm)/Spectrofluorometric detector (LOD = NR; LOQ = NR)	Postcolumn derivatization with o-phthalaldehyde	Latorre-Moratalla et al., 2009
ETL, ME, SPM, AGM, HIS, ET, DIM; OCP, BU, PYR, PR, TYR, DOP, IPR, PUT, CAD, TRP, 3-MBU, PHE, SPD, ET	Cheese	5 g of sample with 12 mL of 0.6 N HClO ₄	UPLC TM system using a Acquity TM UPLC TM column (BEH C ₁₈ , 1.7 µm; 2.1 mm × 50 mm)/UV detector set at 254 nm (LOD = 0.8–16.2 mg kg ⁻¹ ; LOQ = 2.9–60.9 mg kg ⁻¹)	Pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate	Mayer et al., 2010
PUT, CAD	Matured cheddar cheese	5 g of sample and trifluoroacetylacetone were vaporised at high temperature in a SPME vial. The derivatives were recovered from the headspace of the vial using a polydimethylsiloxane divinylbenzene fibre.	GC–MS ion trap system with a capillary column, CP-Sil 8CB (5% phenyl–95% methyl stationary phase); 30 m length × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness (LOD = NR; LOQ = NR)	Gas-phase derivatisation using vapourised trifluoroacetylacetone (derivatisation agent) and methanol	Ali Awan et al., 2008
HIS, TYR, PUT, CAD + amino acids precursor	Edam-cheese	1 g of a grated cheese sample with 4 mL of sodium-citrate buffer (pH 2.2)	IEC system equipped with a column (for biogenic amines: 55 × 3.7 mm Wlled with an ion exchanger Ostion LG ANG; and for free amino acids: 150 × 3.7 mm Wlled with an ion exchanger Polymer AAA)/UV detector at 570 nm (LOD = NR; LOQ = NR)	Post-column derivatization with ninhydrin	Pachlová et al., 2012

HIS: histamine; TYR: tyramine; PUT: putrescine; CAD: cadaverine; PHE: phenylethylamine, SPD: spermidine; SPM: spermine; SER: serotonin; TRP: tryptamine; OCP: octopamine; DOP: dopamine; ETL: ethanolamine; ME: methylamine; DIM: dimethylamine; ET: ethylamine; BU: butylamine; PYR: pyrrolidine; PR: propylamine; IPR: isopropylamine; 3-MBU: 3-methylbutylamine. LOD = Limit of detection; LOQ = Limit of quantification; NR = Not Reported.

have been also proposed. Mazzucco *et al.* (2010) developed a reversed-phase HPLC method for the simultaneous determination in cheese samples of BAs and their precursor amino acids after a precolumn derivatization with dansyl chloride. The authors identified and quantified four amines (CAD, HYS, TRP, and TYR) and their precursors in a semi-hard cow's milk cheese (Toma Piemontese) and in an ewe's milk cheese (Pecorino Sardo). BAs amount and concentration ratios between BA and its precursor amino acid have been proved to be useful in the evaluation of the ripening time of food products.

More recently, Jia, Kanga, Parka, Leeb, and Kwon (2011) aimed to develop an efficient, better performing LC method coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry detection allowing the simultaneous determination of a wide variety of amino acids and BAs in different cheeses. Compared with published reports, the proposed method had the advantages of higher sensitivity, shorter retention time and better separation power in two dimensions.

For all of the above-mentioned methods, a derivatization procedure was always accomplished. However, this step increases the risk of low recovery, analyte loss and contamination, and involves long analysis time. Gosetti, Mazzucco, Gianotti, Polati, and Gennaro (2007) developed a LC method with tandem mass spectrometry detection, for the simultaneous identification and determination of six biogenic amines most commonly present in Toma Piemontese, Raschera and Castelmagno cheeses, without derivatization. This technique allowed to achieve a good sensitivity, by increasing the signal to noise ratio, although, due to the relevant matrix effect, the analysis was possible only if calibration plots based on standard additions method were constructed.

Giannotti *et al.* (2008) proposed a method in which both the chromatographic separation and the mass spectrometry detection have been improved for the determination of CAD, HYS, SPD, SPM, TRP, PUT and TYR in the analysis of Castelmagno cheese. The determination was based on the Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography (HILIC) separation hyphenated with hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry equipped with an Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) and Turbo Ion Spray (TIS) sources. The major advantages were represented by the lower times required for the sample pre-treatment and by an improved chromatographic separation while the major drawback was represented by the relevant matrix effect and the general unbalanced concentrations of the different amines in cheese.

An alternative approach to liquid-phase extraction and derivatisation include on-fibre derivatisation with solid-phase microextraction. Ali Awan, Fleet, and Paul Thomas (2008) extended the concept of on-fibre derivatisation to the recovery of gas-phase derivatisation products, where the derivatisation and extraction of PUT and CAD occurred simultaneously in the headspace of a sample vial using vapourised samples and derivatisation reagents at elevated

temperature (90–120 °C). Such an approach uses small (ng) quantities of sample-extract and derivatising reagent in a gas-phase derivatisation reaction that in turn minimizes the effect of the sample matrix. Trifluoroacetylacetone was selected as the derivatisation reagent in this work, as the trifluoromethyl group enhances the volatility of derivatised molecules making it suitable to use in conjunction with GC–MS and GC–FID. The method was found to be a straightforward single step procedure that was unaffected by complex sample matrices and was successfully tested on samples of matured cheese. Examination of chromatographic peaks showed that the compounds were not subject to significant matrix interferences and that quantification of the BAs was a feasible proposition.

Traditional HPLC methods allow the determination of a wide variety of BAs, but the time required to carry out the analysis is relatively long, between 20 and 60 min per sample. Ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) is a new generation of chromatographic techniques allowing a drastically reduction on time analysis while increasing resolution and sensitivity. Latorre-Moratella *et al.* (2009) validated a rapid, precise, and versatile UHPLC method coupled with an on-line o-phthalaldehyde postcolumn derivatization. The method allowed to determine 12 BAs in a cheese sample in less than 7 min of chromatographic elution, showing a satisfactory linearity, sensitivity, precision, and accuracy. The shortening of the run time was between 5-fold and 11-fold less in comparison with the conventional existing HPLC methods. This allows the analysis of a large number of samples spending not only less time but also less solvent volumes, which is in agreement with environmental sustainability criteria.

Mayer, Fiechter, and Fischer (2010) proposed a fast and reliable UHPLC method for the determination of BAs in different cheeses. After pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate, 20 primary and secondary biogenic amines were separated on an Acquity™ UHPLC within 9 min. The method was applied to the analysis of 58 cheese samples as retailed in Austria.

More recently, LC method with evaporative light scattering detection (ELSD) was presented a useful alternative or detection of BAs in foods. ELSD response is based on the amount of light scattered by analyte particles created by evaporation of a solvent as it passes through a light beam. Therefore, the resulting signal corresponds to all compounds present in the sample which do not evaporate or decompose during evaporation of the solvent or mobile phase permitting to quantify any solute less volatile than the solvent. The whole methodology, comprehensive of the homogenization–extraction process and LC–ELSD analysis, has been validated by Restuccia *et al.* (2011) in the evaluation of a typical Calabria POD cheese, known as Caciocavallo Silano. The proposed methodology allowed the separation and determination in 35 min with a good

resolution, of six biogenic amines without any derivatization step.

In addition to analytical methodologies previously described, several methods to detect the production of BA through microorganisms have been developed (Linares *et al.*, 2011). With respect to the detection of producer microorganisms, screening methods were initially based on the use of differential media containing a pH indicator to identify the BA-producer strains. However, these methods require the isolation and growth of the producer microorganism, and are therefore laborious and time-consuming.

The characterization of the genes encoding the decarboxylating enzymes led to the development of new methods based on Polymerase Chain Reaction (PCR). A relationship between the presence of the gene encoding the decarboxylase and the capacity to synthesize BA has been shown by several authors (Fernandez, Linares, & Álvarez, 2004; Landete, Ferrer, & Pardo, 2005). A strain carrying aminoacyl-decarboxylase genes is a potential BA producer and its presence should be avoided in food. Therefore, these genes are good candidates for the design of specific primers for detecting BA-producer strains by PCR. Several sets of primers have been developed for the detection of TYR-producing lactic acid bacteria (LAB) (Coton & Coton, 2005; Fernandez *et al.*, 2004). PCR has successfully been used with cheese samples in this respect (Fernandez *et al.*, 2004), and has been also used for the detection of TYR-producing bacteria during cheese manufacture (Fernandez, Florez, Linares, Mayo, & Álvarez, 2006). An important benefit of this technique is the detection of producer microorganisms before BAs themselves are detected in the sample; such detection can help predict the likely accumulation of BAs in the final product. This method can be used at any stage of cheese manufacture and could be a useful tool for dairy product companies. The method was also used on marketed cheese samples providing a good correlation with HPLC results (Fernández, Linares, Rodríguez, Álvarez, 2007). Three sets of primers have been developed for the detection of Gram positive HYS-producing bacteria (Coton & Coton, 2005; Landete *et al.*, 2005), and two sets of primers have been proposed for the detection of Gram negative HYS producing bacteria (de las Rivas, Marcobal, Carrascosa, & Munoz, 2006). In addition, several sets of primers have been proposed for the detection of CAD and PUT-producing strains (de las Rivas *et al.*, 2006). Although sensitive and specific under optimized conditions, conventional PCR has two drawbacks: the need to analyse the data by traditional endpoint analysis, and the impossibility of template quantification. Real time quantitative PCR (q-PCR) offers a potential alternative. This allows continuous monitoring of the PCR amplification process and, under appropriate conditions, the quantification of the target DNA present in the sample. A new set of primers has been designed for the detection of HYS-producing LAB by q-PCR (Lucas, Claisse, & Lonvaud-Funel, 2008). In 2 h this method can determine the HYS-producing

capacity of a strain, and it has been successfully applied during the phases of cheesemaking process and on the final product (Ladero, Linares, Fernández, & Álvarez, 2008). Low CT values (which correspond to large numbers of HYS producing LAB) in the early stages of manufacture correlated well with high concentrations of HYS in mature cheese samples. The same authors reported the design of a qPCR method for the detection and quantitation of the microorganisms responsible for TYR production in cheeses (Ladero, Martinez, Martin, Fernandez, & Álvarez, 2010). The method was validated using 57 cheese samples in which the TYR concentration was analysed by HPLC.

BAs in cheese

The principal biogenic amines found in cheese are generally TYR, HYS, CAD, PUT and TRP. However wide variations in their concentrations have been observed, mostly related with milk hygienic conditions and cheese manufacturing practices (Table 2).

Microbiological aspects

Increases in the amine content of cheese may be attributable to various microorganisms possessing amino acid decarboxylase activity. They can be found among starter lactic acid bacteria (LAB), non-starter lactic acid bacteria (NS-LAB) and/or other spontaneous microflora although it is difficult to find a straight correlation between microbial counts and BAs content in cheese, because amine-producing abilities of different strains of various bacteria differ widely (Halász, Baráth, Simon-Sarkadi, & Holzapfel, 1994). In many cases, the accumulation of BAs has been attributed mainly to the activity of the non-starter microflora. However an indirect role of the starter LAB can be hypothesized as the peptidases released by the lysis of starter LAB could be essential to provide precursor amino acids (Valsamaki, Michaelidou, & Polychroniadou, 2000). It follows that, during the fermentation process, BAs formation can be controlled by using the starter cultures that are less effective in decarboxylating the amino acids and the inability to produce BAs should be considered an indispensable condition of strains intended to be used as starters. To this regard, the European Food Safety Agency (EFSA) has recently introduced a system for a pre-market safety assessment of selected taxonomic groups of microorganisms leading to a 'Qualified Presumption of Safety' (QPS) European equivalent of the Generally Recognized As Safe (GRAS) status (EFSA, 2007). Another approach to reduce BAs in cheese is to use starter cultures with amine oxidase able to degrade BAs (Chong, Abu Bakar, Russly, Jamilah, & Mahyudin, 2011).

The genus *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* and the family *Enterobacteriaceae* all contain some strains that have been described as some of the main amine producers in cheese (Galgano *et al.*, 2001; Halász *et al.*, 1994; Martuscelli *et al.*, 2005;

Table 2. Cheese BAs content (mg kg⁻¹).

Cheese	HIS	TYR	PUT	CAD	PHE	SPD	SPE	References
Acid curd cheese	51.3–55.0	335.0	449.0	628.0	–	–	–	EFSA, 2011
Appenzeller	51.9	375.5	8.2	8.3	9.2	6.2	16.4	Mayer et al., 2010
Asino cheese (Italian)	245.87	278.39	410.22	616.07	ND	ND	ND	Innocente et al., 2009
Azeitão (Portuguese) cheese	682.0	445.0	137.0	161.0	–	–	17.2	Pinho et al., 2001
Bergader Edelpilz,	37.1	13.6	28.6	5.9	ND	23.7	–	Mayer et al., 2010
Bavarian cheese								
Bergbaron	34.2	192.3	64.0	54.2	312.2	4.5	16.2	Mayer et al., 2010
Bergkäse Premium	80	134.4	ND	ND	ND	ND	ND	Mayer et al., 2010
Blue cheese	21.3–63.0	63.2–10.0	20.9–62.0	8.31–12.0	–	–	–	EFSA, 2011
Blue Danish soft cheese	ND	6.8	13.0	2.0	2.3	11.1	16.5	Mayer et al., 2010
Blue pasteurized milk cheese	127.0	526.6	237.5	89.4	ND	–	–	Fernández, Linares, Rodríguez et al., 2007
Blue raw milk cheese	1041.0	1051.0	875.8	756.7	27.4	–	–	Fernández, Linares, Rodríguez et al., 2007
Blue veined (France)	0–1051.1	–	–	–	–	–	–	Ladero, Calles, Fernández, & Alvarez, 2010
Brie	30.9–40.0	–	–	–	–	–	–	Ladero et al., 2009
Cabrales blue (Spain)	957.6	–	–	–	–	–	–	Ladero, Calles et al., 2010
Caciocavallo Silano (Italy)	43.0	29.0	16.0	–	10.0	4.0	26.0	Restuccia et al., 2011
Caciotta HPH milk	5.7	28.0	8.3	10.1	ND	1.8	ND	Lanciotti et al., 2007
Caciotta pasteurized milk cheese	7.3	5.6	8.3	44.9	3.9	1.4	1.2	Lanciotti et al., 2007
Caciotta raw milk cheese	8.4	9.0	10.7	24.9	ND	2.4	ND	Lanciotti et al., 2007
Camembert	0–40.0	0–4.9	0–82.2	0–266.8	ND	ND	ND	Ladero et al., 2009
Cantal (French)	94.7–165.6	323.4–486.4	28.0–40.8	0–2.1	0–13.0	6.8–10.6	ND	Mayer et al., 2010
Castelmagno (Italian) cheese	645.8	1009.1	–	310.4	–	0.4	449.6	Gosetti et al., 2007
Cheddar	25.4–40.0	–	4.8	–	–	18.2	8.5	Valsamaki et al., 2000; Ladero et al., 2009
Cheddar Rot, Irish hard cheese	25.4	ND	4.8	ND	ND	8.5	18.2	Mayer et al., 2010
Curd	1.0	2.0	0.9	0.7	–	–	–	Novella-Rodríguez, Veciana-Nogues, Saldo et al., 2002
Dutch-type semi-hard cheese	1.8–17.1	15.7–299.8	6.0–60.8	0.7–2.0	1.0–54.3	0.1–0.2	0–0.3	Komprda et al., 2007, 2008
Edam	0–3.2	–	–	ND	–	–	–	Ladero et al., 2009; Mayer et al., 2010
Emmental	23.5–117.5	52.5–64.5	3.9–38.0	98.3	ND	14.0–16.8	28.5	Ladero et al., 2009; Mayer et al., 2010
Feta cheese	84.6	24.6	19.3	82.8	4.94	–	–	Valsamaki et al., 2000
Fresh cheese	3.2–38.0	12.8–48.0	5.5–41.0	10.7–45.0	–	–	–	EFSA, 2011
Gamonado blue (Spain)	188.4	–	–	–	–	–	–	Ladero, Calles et al., 2010
Goat cheese (Spain)	453.7	–	–	–	–	–	–	Ladero, Calles et al., 2010
Gorgonzola	23.7–255.3	13.2–247.6	3.2–31.3	33.7–748.2	ND	0–17.2	0–10.8	Mayer et al., 2010
Gorgonzola (Brazilian) cheese	13.5	3.9	4.1	2.5	4.3	4.4	2.5	Vale & Glória, 1998

(continued on next page)

Table 2. (continued)

Cheese	HIS	TYR	PUT	CAD	PHE	SPD	SPE	References
Gouda	40.0	ND	ND	ND	ND	1.7	0.5	Ladero et al., 2009
Gouda (Brazilian) cheese	28.4	7.0	23.3	7.3	2.5	3.0	2.7	Vale & Glória, 1998
Grana	249.0	18.0	ND	ND	ND	ND	ND	Mayer et al., 2010
Grated Parmesan (Italian) cheese	148.0	103.0	6.1	12.7	8.6	0.3	2.5	Custodio et al., 2007
Greyerzer Swiss hard cheese	3.3	14.1	6.7	2.7	ND	ND	ND	Mayer et al., 2010
Idiazabal (Spain)	103.6	238.0	103.3	77.1	–	–	–	Ordoñez et al., 1997; Ladero, Calles et al., 2010
Le Rosé Affineur (with rosé wine)	85.5	27.6	ND	ND	ND	75.1	22.1	Mayer et al., 2010
Manchego	160.4	–	–	–	–	–	–	Ladero, Calles et al., 2010
Manchego type (Spain)	28.5–296.9	–	–	–	–	–	–	Ladero, Calles et al., 2010
Minas (Brazilian) cheese	3.3	ND	2.7	0.3	0.9	2.0	2.6	Vale & Glória, 1998
Moosbacher	68.4	ND	9.5	ND	ND	16.4	ND	Mayer et al., 2010
Mozzarella	40.0	–	–	–	–	–	–	Ladero et al., 2009
Ölmützer Quargel	9.1	479.7	523.2	748.2	ND	18.5	16.6	Mayer et al., 2010
Otlu peynir (herby cheese)	0–681.5	18.0–112.5	0–847.0	0–1844.5	0–100.0	–	–	Andic et al., 2010a
Parmesan	10.9–40.0	6.4–29.9	1.8–75.9	3.2–15.6	0–9.5	0–4.5	4.4–7.7	Innocente et al., 2002; Ladero et al., 2009; Mayer et al., 2010
Pasteurized goat's milk cheese	6.3	10.9	14.6	32.7	8.9	–	–	Novella-Rodríguez et al., 2004
Pecorino Abbruzzese	76.0–261.0	280.0	200.0	80.0	163.0–205.0	20.0	ND	Martuscelli et al., 2005
Pecorino from Carmasciano	65.5	136.4	ND	ND	–	≈340	≈100	Mercogliano, De Felice, Chirillo, & Cortesi, 2010
Pecorino from Farindola	0–21.8	52.3–1171.3	9.9–394.0	26.8–276.1	0–127.1	25–143.9	–	Schirone et al., 2011
Pecorino HPH milk	3.4	162.0	14.8	20.3	19.5	ND	ND	Lanciotti et al., 2007
Pecorino pasteurized milk cheese	23.9	350.0	70.9	257.0	155.0	ND	ND	Lanciotti et al., 2007
Pecorino raw milk cheese	6.3	162.0	29.3	107.0	63.3	ND	ND	Lanciotti et al., 2007
Prato (Brazilian) cheese	16.0	2.1	3.0	2.6	2.1	4.4	1.7	Vale & Glória, 1998
Rahmbrie, Austria	3.9	ND	ND	2.0	ND	4.4	16.3	Mayer et al., 2010
Raw goat's milk cheese	43.1	324.6	86.4	196.4	27.3	–	–	Novella-Rodríguez et al., 2004
Raw milk Manchego cheese	226.0	305.1	–	–	–	–	–	Fernández-García, Tomillo, & Nuñez, 1999
Reaschera (Italian) cheese	452.4	153.9	–	118.9	–	10.6	352.6	Gosetti et al., 2007
Ripened pasteurized milk cheese	65.4	301.0	175.3	ND	ND	–	–	Fernández, Linares, Rodríguez et al., 2007
Ripened raw milk cheese	510.2	453.7	176.3	328.4	40.7	–	–	Fernández, Linares, Rodríguez et al., 2007
Robiola from Roccaverano (Italian) cheese	1.8	2.1	–	–	–	–	–	Bonetta et al., 2008
Roquefort	9.9–376.6	0–2000.0	18.3–257.2	0–2101.4	0–39.7	0–18.1	0–4.6	Mayer et al., 2010; Novella-Rodríguez et al., 2003

Schärdinger Österkron	9.2	8.9	ND	3.1	ND	20.3	ND	Mayer et al., 2010
Schlierbacher	15.4	160.8	6.9	2.2	ND	14.5	17.3	Mayer et al., 2010
Schlieb. Klosterkäse	8.1	4.5	1.7	ND	ND	4.7	16.2	Mayer et al., 2010
Schloßkäse, classic								
Schlierbacher Klosterkäse	15.4	160.8	6.9	2.2	ND	14.5	17.3	Mayer et al., 2010
Romadur								
Semicotto Caprino	1.8	3.2	9.0	1.2	1.5	1.4	0.2	Galgano et al., 2001
Semihard Montasio Italian	378.1	373.1	286.5	30.2	12.7	ND	ND	Innocente & D'Agostin, 2002
Semiripened cow	24.4–65.4	32.9–80.9	22.6–175.4	0–3–49.0	0–25.7	0–23.4	0–24.3	Latorre-Moratalla 2009; Fernández, Linares, Rodríguez et al., 2007
Semiripened goat	27.7	30.5	18.2	ND	–	–	–	Fernández, Linares, Rodríguez et al., 2007
Semiripened sheep	ND	301.6	ND	ND	–	–	–	Rodríguez et al., 2007
Smear	168.3	247.6	31.3	748.2	ND	16.6	18.5	Rodríguez et al., 2007
Smoked (Spain)	21.7–216.8	–	–	–	–	–	–	Mayer et al., 2010
Soft (Spain)	80.9	–	–	–	–	–	–	Ladero, Calles et al., 2010
Terrincho (Portugese) cheese	15.6	216.2	217.8	349.7	9.4	–	–	Ladero, Calles et al., 2010
Terrincho (Portugese) cheese	0–10.9	0–203.1	82.6–446.5	48.6–239.6	12.9–237.8	–	–	Pinho et al., 2004
Tilsit (Brazilian) cheese	16.1	3.1	11.5	10.6	5.4	5.1	9.7	Pintado et al., 2008
Tiroler Almkäse	820.6	189.9	27.4	9.3	ND	ND	ND	Vale & Glòria, 1998
Tholstrup Castello, Danish soft cheese	5.4	ND	1.7	2.1	2.0	12.7	17.8	Mayer et al., 2010
Toma	23.1	111.0	330.0	220.0	–	–	–	Mayer et al., 2010
Toma Piemontese (Italian) cheese	587.6	282.3	–	1.3	–	6.6	193.8	Gennaro, Gianottia, Marengo, Pattono, & Turi, 2003
Unripened pasteurized milk cheese	60.2	22	ND	ND	ND	–	–	Gosetti et al., 2007
Unripened raw milk cheese	110.8	233.3	38.7	96.3	ND	–	–	Fernández, Linares, Rodríguez et al., 2007
Vergeer Kaas, Dutch	26.1–30.6	2.9–27.7	0–1.8	104.4–243.4	2.1–7.0	4.2–28.8	16.3–16.6	Fernández, Linares, Rodríguez et al., 2007
Washed rind cheese	8.5–54.0	31.6–76.0	32.3–72.0	147.0–186.0	–	–	–	Mayer et al., 2010
Wildler Kaiser	46.2	39.1	ND	ND	ND	9.0	16.9	EFSA, 2011
Woerle Tilsit cheese	168.3	247.6	31.3	73.0	ND	4.4	ND	Mayer et al., 2010

HIS: histamine; TYR: tyramine; PUT: putrescine; CAD: cadaverine; PHE: phenylethylamine; SPD: spermidine; SPM: spermine. ND: not detected; –: not considered in the study.

Pircher, Bauer, & Paulsen, 2007; Schirone, Tofalo, Mazzone, Corsetti, & Suzzi, 2011).

The genus *Lactobacillus* comprises a great variety of species commonly identified in dairy products and generally dominated the adventitious microbiota in all cheeses. They are considered to produce HYS and PUT and, although most are not described as TYR producers, strains belonging to *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus curvatus* are known to produce this amine in cheese (Roig-Sagués, Molina, & Hernández-Herrero, 2002).

Enterococci comprise a major part of the fresh cheese curd microbiota and in some cases they are the predominant microorganisms in the fully ripened product reaching numbers of up to 10^6 e 10^8 cfu g⁻¹. Their levels in different cheeses depend on the extent of milk contamination and their survival and growth under the particular conditions of cheese manufacture and ripening. The persistence and dominance of enterococci during ripening has been attributed to their wide range of growth temperatures and their high tolerance to heat and salt (Galgano et al., 2001; Sarantinopoulos et al., 2001). Among them, the species most commonly isolated in cheese are *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, followed by *Enterococcus durans* (Giraffa, 2003; Ogier & Serror, 2008). In some varieties of cheese other species such as *Enterococcus hirae*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus devriesei* have been isolated, although in smaller numbers (Martín-Platero, Valdivia, Maqueda, & Martínez-Bueno, 2009). Enterococci are considered TYR formers.

Burdychová and Komprda (2007) isolated Bacteria of the genera *Enterococcus* and *Lactobacillus* and coliform bacteria from Dutch-type semi-hard cheese at the beginning of the ripening period. Conventional and molecular taxonomic analyses identified the following species: *E. durans* (7 strains), *E. faecalis* (3 strains), *E. faecium* (1 strain), *E. casseliflavus* (3 strains), *L. curvatus* (1 strain), *Lactococcus lactis* (1 strain) and *L. helveticus* (1 strain). This analysis showed that TYR producing isolates are members of the genus *Enterococcus* and species *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* and *E. casseliflavus*, while HYS-producing isolates were identified as belonging to the genus *Lactobacillus*. All of the above *Enterococcus* and two of the *Lactobacillus* strains originated from contaminating microbial communities and the *L. helveticus* strain originated from starter culture used for cheese production. Although this study describes HYS as a biogenic amine with a high incidence in cheeses, Bunkova et al. (2010) found different results evaluating, on the same kind of cheese at 3 ripening/storage regimes, the development of HYS, TYR, PUT and CAD. During the 98-day period, HYS was not detected in any of the regimes and, within the cheeses analysed, non-starter lactic acid bacteria *L. curvatus*, *Lactobacillus casei/paracasei* and *Lactobacillus plantarum* were detected as the main producers of the tested BAs.

The incidence of amino acid decarboxylative microbiota and the presence of BAs in Montasio cheese prepared by using different cheese-making practices, were studied by Marino, Maifreni, Bartolomei, and Rondinini (2008). Based on the results obtained, most of the decarboxylative activity in Montasio cheese should be attributed to the LAB microbiota, because the cheese processing and ripening conditions aimed at low numbers of enterobacteria. Tyrosine was the most decarboxylated amino acid by five out of six LAB genera, except mesophilic *Lactobacillus*, who showed a certain ability to produce CAD. Within the lactic acid bacteria, the most decarboxylative were found to be *Streptococcus thermophilus*, followed by enterococci and leuconostoc. *Enterococci* were able to decarboxylate mainly tyrosine while strains belonging to the genus *Leuconostoc* showed almost only tyrosine-decarboxylase activity.

Enterobacteria are recognized as a part of the natural microbiota of many dairy products. Although these microorganisms are usually present in low numbers in the final product, *Enterobacteriaceae* can release their decarboxylases in the early steps of cheese-making generally producing CAD and PUT; the enzyme released, and not the microbial cells, is responsible for the BA accumulation and its action can continue also in the absence of viable cells (Valsamaki et al., 2000). The presence of *Enterobacteriaceae* after 90 days ripening generally indicate a poor microbiological quality of the raw milk, and/or improper milk-handling and manufacturing practices (i.e. contamination of raw milk during milking, unrefrigerated storage and transport as well as contamination of cheese during manufacturing).

The viable numbers of the total (mesophilic) microflora, enterococci, lactococci, lactobacilli, enterobacteria, staphylococci, pseudomonads, yeasts and moulds were determined by 30 d in Terrincho cheeses, were reported by Pintado et al. (2008). Significant correlations were observed between viable numbers of enterococci and PHE concentrations, between lactococci and CAD and TYR and between enterobacteria and TRP. Enterococci and lactobacilli reached levels of 10^7 cfu g⁻¹, but other microbiological groups implicated in BAs production (i.e. enterobacteria) were also quite high in number. This confirm other results showing that a minimum concentration of BA producers in the raw material is necessary for significant concentrations of BA to be reached in the final product (Nannelli et al., 2008). More recently, Ladero, Martinez et al., (2010a) applied a qPCR method for the detection and quantification of the microorganisms responsible for TYR production in 57 cheese samples. TYR-producing bacteria were detected in different numbers in all samples, although TYR itself was only detected in 56.1% of the samples suggesting that irrespective of technological parameters, the presence of TYR-producing bacteria over a threshold limit of 10^4 cfu g⁻¹ led to the accumulation of TYR beyond recommendable limits.

The same authors (Ladero, Fernández, Cuesta, & Álvarez, 2010) accomplished the quantitative detection and identification of TYR-producing enterococci and lactobacilli by multiplex qPCR during the manufacture of different commercial cheeses. TYR-producing bacteria of all the studied groups were detected in all the cheese samples analysed although in variable concentrations. TYR-producing enterococci were the most abundant in many samples, followed by *L. curvatus* and *L. brevis*. Only in two samples, corresponding to blue-veined cheeses, was *L. curvatus* the prevalent TYR producer, with numbers 10 times those recorded for the enterococci. Also in this case, most of the samples with TYR producer numbers over the previously proposed threshold concentration of 10^4 cfu g⁻¹ (Ladero, Martínez *et al.*, 2010) had a TYR concentration of over 200 mg kg⁻¹.

Technological aspects

Kind of milk and milk treatments

Few and contradictory literature data are available on the specific effect of the type of milk on the BAs content of cheese (Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, Izquierdo-Pulido, & Vidal-Carou, 2003; Roig-Sagués *et al.*, 2002).

More recently Ladero *et al.* (2008) reported the concentrations of HYS found in 80 cheeses made from different types of milk (goat, cow and sheep). HYS presence did not seem to be associated with a certain type of milk used in the cheese production, since it was detected in all types of samples irrespective of the origin of the milk. On the basis of their results, authors drafted the general conclusion that the HYS content of cheese depended more on the microbiological quality of the milk than on the type of milk used. However, Lanciotti *et al.* (2007), found that ovine cheese were characterized by a remarkably higher accumulation of BAs than bovine cheeses being at the end of ripening about 850 mg kg⁻¹ and 70 mg kg⁻¹, respectively. TYR and CAD were the most abundant BAs in Pecorino (ovine milk) while in the samples of Caciotta (bovine milk), the diamines, PUT and CAD, were found at higher concentrations.

Pasteurization is the most common milk treatment used during cheese-making to reduce the numbers of pathogenic and spoilage microorganisms and many authors found that its application is able to reduce the concentration of BAs in cheese. In fact, many decarboxylating bacteria such as *Enterobacteriaceae* and *Enterococcus* do not survive thermal treatment (Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, Roig-Sagués, Trujillo-Mesa, & Vidal-Carou, 2004; Ordoñez, Ibañez, Torre, & Barcina, 1997), this being the main explanation for the lower BAs contents generally found in cheeses from pasteurized milk in comparison with those obtained from raw milk (Fernández, Linares, Rodríguez, & Álvarez, 2007; Gennaro *et al.*, 2003; Ladero *et al.*, 2008; Ladero, Martínez *et al.*, 2010; Novella-Rodríguez *et al.*, 2003, 2004; Ordoñez *et al.*, 1997). However, data obtained by Ladero, Martínez *et al.* (2010a), pointed out that

pasteurization reduces, but does not completely eliminate the number of TYR-producing bacteria and demonstrated that not only a minimum number of TYR-producing microorganisms are necessary for amine accumulation but also an appropriate environmental conditions.

The same authors (Ladero, Sánchez-Llana, Fernández, & Álvarez, 2011) studied the resistance of the most common species responsible for BAs production in dairy products to pasteurization (63 °C for 30 min), concluding that many native, metabolically active BAs producers could be found in pasteurized milk owing to their resistance to the thermal treatment. It follows that, although the main explanation of the reduced BAs content in cheeses derived from pasteurized milk is connected with the reduction in the number of microorganisms involved in BAs formation, other factors should be considered such as the slower rate of proteolysis observed in cheeses made from pasteurized milk (Lau, Barbano, & Rasmussen, 1991) and the inactivation by heat of the pyridoxal phosphate which is the cofactor for decarboxylase activity (Ladero *et al.*, 2008). Anyway, it should be kept in mind that deficient hygienic conditions can promote contamination with BA-producing microorganisms during the manufacture of cheese after the thermal treatment has been accomplished, leading to accumulation at elevated concentrations of BAs in cheeses derived from pasteurized milk as well (Fernández, Linares, Rodríguez *et al.*, 2007; Ladero, Fernández, & Álvarez, 2009; Lanciotti, 2007; Marino *et al.*, 2008; Pircher *et al.*, 2007).

Application of pressure in the range of 100–1000 MPa is one of the most promising methods of food treatment and food preservation at room temperature as the application of the non-thermal technology has the advantages of maintaining sensory and nutritional properties of foods. However, Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, Saldo, and Vidal-Carou (2002) reported that the application of 50 MPa for 72 h produced the highest amine concentrations and three times higher TYR concentration as compared to untreated goat cheese. By contrast, the amine content of sample treated with higher pressure for short time (400 MPa for 5 min) was similar to control lot. The same authors (Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, Trujillo-Mesa, & Vidal-Carou, 2002), compared the BAs profile throughout the ripening of goat cheese made from high hydrostatic pressurized milk (500 MPa for 15 min, 20 °C) with that obtained from pasteurized milk. TYR was the prevailing amine in both cheeses, followed by CAD, PUT, and HYS being the total BAs levels comparable in cheese samples being indifferent to the kind of milk treatment (pressurization or pasteurization).

More recently Lanciotti *et al.* (2007) evaluated the BA content in cheese samples derived from milk subjected to high pressure homogenization (HPH) at 100 MPa before cheese-making, in comparison with cheeses obtained with raw and thermized milk. In this case obtained results showed that the HPH treatment of milk was able to

drastically reduce the BAs concentrations in all cheese typologies at the end of ripening. The microbial data of milks used for cheese-making indicated that thermal and HPH treatments reduced the wild microflora although some quantitative differences between the two treatments could be found in particular for lactobacilli and *Micrococcaceae*. However, authors underlined that this difference could only partially justify the reduction of BAs content in the samples obtained from HPH milk, suggesting other possibilities. In particular they hypothesized a selection of microbial species and strains with less pronounced decarboxylase aptitudes, a diminution of the decarboxylase activities or an influence of the HPH treatment on the characteristics of proteins involved in proteolysis and further subjected to peptidase and decarboxylase activity.

Cheese ripening

Another factor strongly affecting the accumulation of BAs in cheese is the ripening period. The ripening of cheese is a complex phenomenon, producing a series of physico-chemical, biochemical and biologic events strictly connected among themselves. The substrate is represented by the casein, but the process involves also lipids and the soluble components (sugar, lactic acid, citric acid, etc.). The ripening process is carried out by starter LAB and the secondary microbiota, including NS-LAB, propionic acid bacteria, moulds and yeasts. Starter bacteria contribute to the protein degradation while the NS-LAB are responsible of the peptidolysis and the release of BAs precursor free amino acids (Martuscelli *et al.*, 2005). Free amino acids can be further decarboxylated by bacterial enzymes, producing the accumulation of BAs. Therefore, prolonged ripening times is considered one of the main causes of the BAs increasing in cheese, as reported by several authors (Bunkova *et al.*, 2010; Gosetti *et al.*, 2007; Marino *et al.*, 2008; Martuscelli, 2005; Novella-Rodríguez *et al.*, 2003; Ordoñez *et al.*, 1997; Valsamaki *et al.*, 2000). It follows that BAs contents in ripened cheeses are in general, much higher than those in unripened cheeses (from 10 to 2000 times higher) although, wide BAs variations have been observed among samples of similar ageing, mostly related with the intensity of the ripening process (Mayer *et al.*, 2010; Novella-Rodríguez *et al.*, 2003).

In the raw material (milk), polyamines are generally the most abundant as they can be naturally found in foods and do not necessarily result from bacterial metabolism (Novella-Rodríguez *et al.*, 2003). Very small amounts or no BAs have been also found in unripened cheeses suggesting that the presence of high quantities of amines in these type of cheeses should be considered only as a consequence of a poor hygienic milk quality. Generally speaking, TYR, PUT and CAD have been reported as the main amines in unripened cheeses and the higher levels of polyamines in this class of cheeses in comparison with those found in milks, seem to reflect only a concentration effect (Lanciotti *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 2010; Novella-

Rodríguez, Veciana-Nogués, & Vidal-Carou, 2000; Valsamaki *et al.*, 2000).

In the ripened cheeses, TYR, PUT, CAD, HYS, and, at lower concentrations, β -PHE and TRP, are generally detected. SPD and spermine were found in most samples of ripened cheeses and, in general, SPD was the prevailing polyamine (Lanciotti *et al.*, 2007; Novella-Rodríguez *et al.*, 2003), while other studies report an opposite trend (Gosetti *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 2010). Unlike unripened cheeses, the higher contents of SPD and SPM observed in ripened cheeses could hardly be explained by a concentration effect only, supporting the idea that the production of polyamines throughout the ripening process can take place as well.

Evans, Gray, and Kazim (1988), indicated that all blue cheeses had higher levels of BAs than non blue cheeses, this phenomenon being related with the increased proteolytic activity connected to the particular cheese-making process. Novella-Rodríguez *et al.* (2003) showed that TYR, CAD, PUT and HIS were the main BAs in blue cheeses although, more recently, Rabie, El-Saidy, El-Badawy, Siliha, and Malcata (2011) and Rabie, Siliha, El-Saidy, El-Badawy, & Malcata, 2011 found a different order (TYR, HIS, PUT and SPD) with TYR and HIS as the main amines also in γ -irradiated blue cheeses (Rabie, El-Saidy *et al.*, 2011; Rabie, Siliha *et al.*, 2011). High HIS concentrations were detected in blue cheeses by Ladero *et al.* (2008) connected to the presence of fungi with strong proteolytic activity (Cantor, van den Tempel, Hansen, & Ardö, 2004). Moreover, Boer and Kuik (1987) have reported an improvement of the outgrowth of *Enterobacteriaceae* during ripening of blue cheese, due to the pH increases from 4.5–4.7 to 6.0–6.4, as a result of acid lactic metabolism of *Penicillium roqueforti*.

Chemical–physical parameters (pH, NaCl and ripening temperature)

The primary purpose of a dairy starter culture is to produce lactic acid from lactose by fermentation, thus lowering the pH. Amino acid decarboxylating enzymes show optimum activity at acid pH as a mechanism of environment neutralization against an excessive pH decrease which is incompatible with bacterial growth. Therefore, low pH, in particular between 4 and 5.5, can favour amine production (Fernández, Linares *et al.*, 2007; Marcobal, Martín-Alvarez, Moreno-Arribas, Muñoz, & 2006). Andic, Genccelep, & Kose (2010) found a specific correlation between BAs and organic acids for herby cheeses; pH values of the considered samples varied from 4.03 to 6.09 and generally, the pH value was found high in samples that had low biogenic amines levels. Moreover, samples with low contents of total organic acids generally showed lower concentrations of total BAs, while samples with high contents of total organic acids also had higher concentrations of all determined BAs. According to the results of this research, there were significant positive correlation, between acetic

acid and PHE, PUT, CAD, HYS and TYR. Also, there was significant positive correlation between total organic acids and HYS and TYR.

The effects of salt during cheese preparation include control of microbial growth and activity, control of various enzyme activities, reduction of cheese moisture content and physical changes in cheese proteins that can influence cheese texture, flavour development and formation of BAs from free amino acids. Different salt content could be related with the variation of microflora composition, leading in a second time to different BAs formation. In particular low NaCl concentrations seem to improve the accumulation of BAs while high salt concentrations seem to inhibit BAs production. The decrease of the BAs concentration could be explained by the inhibitory effect of high salt content on the growth rate of BA-producing bacteria (Gardini *et al.*, 2001) and/or on the amino acid decarboxylation activities (Chander, Batish, Babu, & Bhatia, 1988).

In the study of Andic, Genccelep, and Kose (2010) reporting the BAs contents of 30 samples of herby cheeses, the salt content of the samples was found between 4.73 and 13.80% and generally the salt value was high in samples that had low BAs levels. The prevailing amine was in all cases TYR (18.0–1125.5 mg kg⁻¹), followed by CAD (ND-1844.5 mg kg⁻¹) or PUT (ND-847.0 mg kg⁻¹); HYS content generally was found higher than 100 mg kg⁻¹.

The simultaneous effects of processing factors on BAs content, proteolysis and sensory score of Iranian white brine cheese were studied in 12 cheeses also by Aliakbarlu, Alizadeh, Medhi, Rohani, and Agh (2011). It was found that HYS and CAD had the largest quantity while TYR content was negligible. Brine concentration in the range 10–13% has been demonstrated to affect significantly the BAs accumulation in this kind of cheeses. In young cheese samples (ripening time = 25 days), BAs content decreased by increasing brine concentration while in ripened cheese samples, it has positive effect on BAs accumulation. Authors ascribed this effect to sodium chloride enhanced activity of halotolerant lactobacilli which can cause massive formation of CAD and, to a less extent, PUT. On the other hand, decreasing of BAs content in cheese can be had several causes. According to Valsamaki *et al.* (2000), a dynamic equilibrium seems to exist between cheese and brine and many low molecular weight compounds (such as BAs and free amino acids) can migrate from cheese towards the brine.

An opposite trend has been observed by Innocente, Marino, Marchesini, and Biasutti (2009) reporting the presence of biogenic amines in a traditional salted Italian cheese (Asino cheese) which is a traditional cheese ripened in a special dilute brine (salmuerie), mixed with whey, milk and milk cream. The study demonstrated that biogenic amine content increased gradually in the Asino cheese during the soaking phase in brine. Moreover, the BA content of the salmuerie was very high and the salmuerie and the Asino cheese had a similar relative profile in amine content,

suggesting that BAs diffuse into the cheese by means of a migration process generated by a concentration gradient.

It is well known that temperature is another technological parameter strongly affecting the formation of BAs in cheese. Microbial growth, biochemical reactions and production of metabolites generally increase by temperature rising, leading to improved BAs accumulation with time and storage temperature (Halász *et al.*, 1994).

As it seems that the starter culture proteases and peptidases are very active in temperature around 16 °C, Pachlová, Bunka, Flasarová, Váľková, and Bunková (2012) considered the BAs profiles of Dutch-type cheese samples ripened at the current standard temperature (10 °C) in comparison with the Dutch-type cheese whose maturation processes were accelerated by elevation of ripening temperature (16 °C). While HYS was never detected in all samples throughout the entire experiment, the formation of TYR, PUT and CAD were found to be more intensive in accelerated cheese in comparison with the corresponding control samples. Due to increase of ripening temperature by 6 °C, proteolytic activity of cheese microflora approximately doubled accelerating the production of low molecular protein fragments (small peptides and free amino acids) and increasing the NPN (Valsamaki *et al.*, 2000). Also the decarboxylase activity of microorganisms grown substantially at higher incubation temperature (Bunkova *et al.*, 2010; Pinho, Ferreira, Mendes, Oliveira, & Ferreira, 2001) and the total contents of BAs in some cheese samples reached approximately 800 mg kg⁻¹ (accelerated cheese on the 56th day). Authors concluded that the increase of temperature could reduce the ripening time to approximately one half compared to the period of maturation at standard temperature, however it caused greater production of BAs at quite unsafe concentrations.

In the study of Aliakbarlu *et al.* (2011), the interactive effect of ripening time and ripening temperature on biogenic amines content in Iranian white brine cheese was also investigated. It was found that at low level of ripening time, biogenic amine content increased by increasing of ripening temperature while at high level of ripening time, biogenic amines content decreased by increasing of ripening temperature. This contradictory effect of ripening temperature can be attributed to textural changes of cheese curd with time. At the initial stages of ripening time, the curd is firm and produced BAs accumulate in cheese matrix but by increasing of ripening time and softening of cheese texture, amines can diffuse from curd to brine and increase in temperature has positive effect on the diffusion rate. At low level of ripening temperature, biogenic amine content decreased by increasing ripening time and reached to minimum in 50 days. After 50 days, content of biogenic amines significantly increased.

Bunkova *et al.*, 2010 reported that even cold storage temperatures of around 5 °C cannot prevent the biogenic amines content in cheeses from increasing above the

toxicologically significant level proposed by Silla Santos (1996). The development of HYS, TYR, PUT and CAD in Edam-cheese depending on 3 ripening/storage regimes during 98 days showed that the highest BAs content was found in the samples ripened for the whole observation period in the ripening cellar at 10 °C while the lowest values of BAs content were found in all products kept for the first 23 days in the ripening cellar and subsequently kept at cold storage temperature (5 °C).

The effect of lower temperatures (+4 °C and −18 °C) on BAs in Motal cheese during storage periods were investigated by Andiç, Gençcelep, Tunçtürk, and Köse (2010). PUT, CAD, and TYR were the major amines, whereas PHE concentration was very low in all samples. The cheeses stored at +4 °C were found to contain more BAs except PHE and TRP compared with cheeses stored at −18 °C. Once again, at the end of storage, in almost all cheeses stored at +4 °C, HYS content was found to be much higher than 100 mg kg^{−1} and total concentrations were above 1000 mg kg^{−1}. Moreover BAs amounts increased during storage at +4 °C, whereas the amounts remained almost unchanged at −18 °C as microbiological activity is slowed at −18 °C.

Post-ripening processes (cutting, slicing, grating)

During the last years many cheeses undergone post-ripening technologies, such as cutting, slicing, or grating, appeared in the market, implying an increasing of the risk related with microbial contamination.

The effect of the post-ripening processing of different types of cheeses on their HYS and HYS-producing bacteria contents was analysed by Ladero et al. (2009). In a preliminary survey, 59 cheeses, (purchased randomly in entire, portion, sliced and grated formats) were analysed. No detectable levels of HYS were detected in all cheese types except Emmental cheeses showing an average content of 220.8 mg kg^{−1}, the highest concentrations (up to 734.1 mg kg^{−1}) being in grated samples. Significantly more HYS producing bacteria were detected by RT-qPCR in the post-ripening-processed samples than in entire cheeses in all the cheese types analysed. Since HYS was detected only in the Emmental cheese samples, a more in-depth study was performed on this cheese type to determine whether the HYS-producing LAB developed from the raw material or were the result of external contamination during manipulation. No HYS was detected in any of the six cheese blocks used as raw material for grating, while it was detected in four of the grated samples made from these raw blocks. Considering that the analysed cheeses underwent no post-ripening heating, authors concluded that the presence of HYS and HYS producers were related with the manipulation, suggesting that it might had an effect on the development of the intrinsic HYS-producing microbiota, or processing caused the contamination with the HYS producers. However, the fact that no HYS-producing microbiota were generally detected in entire

samples, suggested external contamination to be the origin of these bacteria (contact of the cheese with the equipment surfaces during processing or risk of microbiological contamination due to an increase in the surface/volume ratio).

In their study, Pachlová et al. (2012) considered also cheese slices, founding that BAs content is depended on the slice location as the edge slice showed higher BAs concentration compared with the levels found in the corresponding layers of the central slice. From a qualitative and quantitative point of view, microorganisms in the individual layers of ripening cheese can vary, which can cause a different concentration of biogenic amines in different parts of cheese (Novella-Rodríguez et al., 2003; Pinho et al., 2001).

Packaging

Compared to air packaging, active packaging, vacuum packaging, and MAP inhibit or delay aminogenesis more effectively, through inhibition of BAs forming bacteria or enzyme activity. However, it has been reported that the success of inhibition largely depends on the type of microflora, it is environmental conditions (such as temperature) and also the gas mix used in case of MAP; it may also be product specific (Naila, Flint, Fletcher, Bremer, & Meerdink, 2010).

The only research on cheese dealing specifically with this topic has been accomplished by Andiç, Gençcelep, Tunçtürk et al. (2010). Authors investigated the effect of packaging method (nonvacuum and vacuum) on biogenic amines production in Motal cheese during storage. It was found that packaging method had a significant effect on CAD, HYS, TYR, and PHE concentrations in the samples stored at +4 °C. The non-vacuum-packaged cheeses had higher amounts of PUT, CAD, HYS, and TYR compared with vacuum-packaged cheeses. In cheese packaged using both methods and stored at +4 °C, casein was found to be strongly degraded by the enzymes thus increasing the content of amino acids in cheese.

Conclusion

The production of BAs in fermented products is an extremely complex phenomenon, dependent on several parameters, the interactions and combinations of which are numerous, variable and product-specific. To this regard, monitoring of raw materials and products at multiple points along the food chain could be useful to understand the relevance of these factors during production, distribution and storage of fermented foods. This could lead to a better knowledge of the factors involved in the synthesis and accumulation of BAs and to specific actions for the reduction of their incidence. The current control options to minimise the occurrence of BAs in foods are, in fact, mainly focussed on the food processing level, including raw materials handling and the fermentation process, as they constitute the most important factors for the BAs accumulation.

Also in case of cheese, the optimization of technological conditions should be strictly evaluated. In particular, the pH of cheese (5.0–6.5) is optimum for the activity of most decarboxylases and the production of BAs seem to be accelerated by high temperatures during production and manufacture of cheese, by the prolonged ageing process and low NaCl concentration. However, many chemico-physical parameters cannot be easily modified as they are closely related to the fermentation process. This supports the idea that the main strategies to prevent BAs accumulation in cheese must be addressed towards a reduction of the numbers of BA-producer microorganisms during cheese production. This could be achieved by application of thermal treatments to facilitate the dominance of starter bacteria from the early stages of the fermentation and by selection of starter cultures confirmed as not producing BAs and able to outgrow autochthonous microbiota under conditions of production.

To meet the consumer demand for safer foods by a quantitative risk assessment, further research on BAs should be carried on regarding either their toxicity or their accumulation during production of foods.

References

- Ali Awan, M., Fleet, I., & Paul Thomas, C. L. (2008). Determination of biogenic diamines with a vaporisation derivatisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 111, 462–468.
- Aliakbarlu, J., Alizadeh, M., Medhi, S., Rohani, R., & Agh, N. (2011). Biogenic amines in Iranian white brine cheese: modelling and optimisation of processing factors. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 417–424.
- Amon, U., Bangha, E., Küster, T., Menne, A., Vollrath, I. B., & Gibbs, B. F. (1999). Enteral histaminosis: clinical implications. *Inflammation Research*, 47, 291–295.
- Andic, S., Genccelep, H., & Kose, S. (2010). Determination of biogenic amines in herby cheese. *International Journal of Food Properties*, 13, 1300–1314.
- Andic, S., Gençcelep, H., Tunçtürk, Y., & Köse, S. (2010). The effect of storage temperatures and packaging methods on properties of Motal cheese. *Journal Dairy Science*, 93, 849–859.
- Bardóc, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 341–346.
- Boer, E., & Kuik, D. (1987). A survey of the microbiological quality of blue-veined cheeses. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41, 227–237.
- Bonetta, S., Bonetta, S., Carraio, E., Coisson, J. D., Travaglia, F., & Arlorio, M. (2008). Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese. *Journal of Food Protection*, 71, 205–209.
- Bunkova, L., Bunka, F., Mantlova, G., Cabolva, A., Sedlacek, I., Svec, P., et al. (2010). The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*, 27, 880–888.
- Burdychová, R., & Komprda, T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiological Letters*, 276, 149–155.
- Cantor, M. D., van den Tempel, T., Hansen, T. K., & Ardö, Y. (2004). Blue cheeses. In F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry physics and microbiology* (3rd ed.). (pp. 175–198). London: Elsevier.
- Chander, H., Batish, V. H., Babu, S., & Bhatia, K. L. (1988). Studies on optimal conditions for amine production by *E. coli*. *Milchwissenschaft*, 43, 90–91.
- Chong, C. Y., Abu Bakar, F., Russly, A. R., Jamilah, B., & Mahyudin, N. A. (2011). The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal*, 18, 867–876.
- Coton, E., & Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal Microbiology Methods*, 63, 296–304.
- Custodio, F. B., Tavares, E., & Abreu, G. M. B. (2007). Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 280–288.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Opinion of the scientific committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, 587, 1–16.
- European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *The EFSA Journal*, 9, 2393–2486.
- Evans, C. S., Gray, S., & Kazim, N. O. (1988). Analysis of commercially available cheeses for the migraine induced by tyramine by thin-layer chromatography and spectrometry. *Analyst*, 113, 1605–1606.
- Fernández-García, E., Tomillo, J., & Nuñez, M. (1999). Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 189–196.
- Fernandez, M., Florez, A. B., Linares, D. M., Mayo, B., & Álvarez, M. A. (2006). Early PCR detection of tyramine-producing bacteria during cheese production. *Journal of Dairy Research*, 73, 318–321.
- Fernandez, M., Linares, D. M., & Álvarez, M. A. (2004). Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 67, 2521–2529.
- Fernández, M., Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V., & Álvarez, M. A. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganism. *Journal of Dairy Research*, 74, 276–282.
- Fernández, M., Linares, D. M., Rodríguez, A., & Álvarez, M. A. (2007). Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA655. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1400–1406.
- Galgano, F., Suzzi, G., Favati, F., Caruso, M., Martuscelli, M., Gardini, F., et al. (2001). Biogenic amines during ripening in “Semicotto Caprino” cheese: role of enterococci. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 153–160.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., et al. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 105–117.
- Gennaro, M. C., Gianottia, V., Marengo, E., Pattono, D., & Turi, R. M. (2003). A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry*, 82, 545–551.
- Gianotti, V., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Godetti, F., Bottaio, M., Frascarolo, P., et al. (2008). A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the

- simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*, 1185, 296–300.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215–222.
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Gianotti, V., Polati, S., & Gennaro, M. C. (2007). High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical Piedmont cheeses. *Journal of Chromatography A*, 1149, 151–157.
- Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 42–49.
- Innocente, N., & D'Agostin, P. (2002). Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. *Journal Food Protection*, 65, 1498–1501.
- Innocente, N., Marino, M., Marchesini, G., & Biasutti, M. (2009). Presence of biogenic amines in a traditional salted Italian cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 154–160.
- Jia, S., Kanga, Y. P., Parka, J. H., Leeb, J. S., & Kwon, W. (2011). Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 9174–9182.
- Komprda, T., Burdychová, R., Dohnal, V., Cwiková, O., Sládková, P., & Dvoráková, H. (2008). Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*, 25, 219–227.
- Komprda, T., Smělá, D., Novická, K., Kalhotka, L., Šustová, K., & Pechová, P. (2007). Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*, 102, 129–137.
- Körös, A., Varga, Z. S., & Molnar-Perl, I. (2008). Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1203, 146–152.
- Ladero, V., Calles, M., Fernández, M., & Álvarez, M. A. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6, 145–156.
- Ladero, V., Fernández, M., & Álvarez, M. A. (2009). Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses. *International Dairy Journal*, 19, 759–762.
- Ladero, V., Fernández, M., Cuesta, I., & Álvarez, M. A. (2010). Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. *Food Microbiology*, 27, 933–939.
- Ladero, V., Linares, D. M., Fernández, M., & Álvarez, M. A. (2008). Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: relation with histamine content. *Food Research International*, 41, 1015–1019.
- Ladero, V., Martinez, N., Martin, M. C., Fernandez, M., & Álvarez, M. A. (2010). qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food Research International*, 43, 289–295.
- Ladero, V., Sánchez-Llana, E., Fernández, M., & Álvarez, M. A. (2011). Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 516–521.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Guerzoni, M. E., Suzzi, G., Belletti, N., et al. (2007). Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chemistry*, 104, 693–701.
- Landete, J. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2005). Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal Applied Microbiology*, 99, 580–586.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bosch-Fuste, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2009). Validation of an ultra-high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7715–7720.
- Lau, K. L., Barbano, M., & Rasmussen, R. R. (1991). Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. *Journal of Dairy Science*, 74, 727–740.
- Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Álvarez, M. A., & Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 691–703.
- Lucas, P. M., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2008). High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Applied Environmental Microbiology*, 74, 811–817.
- Marcobal, A., Martín-Alvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., & Muñoz, R. (2006). A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology*, 157, 417–424.
- Marino, M., Maifreni, M., Bartolomei, I., & Rondinini, G. (2008). Evaluation of amino acid decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 540–549.
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 24–32.
- Martuscelli, M., Gardini, F., Torriani, S., Mastrocola, D., Serio, A., Chaves-López, C., et al. (2005). Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 15, 571–578.
- Mayer, H. K., Fiechter, G., & Fischer, E. (2010). New ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*, 1217, 3251–3257.
- Mazzucco, E., Gosetti, F., Bobba, M., Marengo, E., Robotti, E., & Gennaro, M. C. (2010). High-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. Applications in food chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 127–134.
- Mercogliano, R., De Felice, A., Chirillo, C., & Cortesi, M. L. (2010). Production of vasoactive amines during the ripening of Pecorino Carmasciano cheese. *Veterinary Research Communications*, 34, 175–178.
- 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, R139–R150.
- Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., & Lucas, P. M. (2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 594–599.
- 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.
- Novella-Rodríguez, S. N., Veciana-Nogués, M. T., Roig-Sagues, A. X., Trujillo-Mesa, A. J., & Vidal-Carou, M. C. (2004). Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*, 71, 245–252.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Saldo, J., & Vidal-Carou, M. C. (2002). Effects of high hydrostatic pressure treatments on biogenic amine contents in goat cheeses during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7288–7292.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Trujillo-Mesa, A., & 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-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2000). Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5117–5123.
- Ogier, J. C., & Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms – the *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 291–301.
- Önal, A. (2007). A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 1475–1486.
- Ordoñez, A. I., Ibañez, F. C., Torre, P., & Barcina, Y. (1997). Formation of biogenic amines in Idiazabal ewe's-milk cheese: effect of ripening, pasteurization, and starter. *Journal Food Protection*, 60, 1371–1375.
- Pachlová, V., Bunka, F., Flasarová, R., Váľková, P., & Bunková, L. (2012). The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. *Food Chemistry*, 132, 1846–1854.
- 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*, 75, 287–291.
- Pinho, P., Pintado, A. I. E., Gomes, A. M. P., Pintado, M. M. E., Malcata, F. X., & Ferriera, I. M. (2004). Interrelationships among microbial, physiochemical, and biochemical properties of Terrincho cheese, with emphasis on biogenic amines. *Journal of Food Protection*, 67, 2779–2785.
- 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.
- Pircher, A., Bauer, F., & Paulsen, P. (2007). Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*, 226, 225–231.
- Rabie, M. A., El-Saidy, S., El-Badawy, A. A., Siliha, H., & Malcata, F. X. (2011). Biogenic amine contents in selected Egyptian fermented foods as determined by ion-exchange chromatography. *Journal of Food Protection*, 74, 681–685.
- Rabie, M. A., Siliha, H., El-Saidy, S., El-Badawy, A. A., & Malcata, F. X. (2011). Effect of γ -irradiation upon biogenic amine formation in blue cheese during storage. *International Dairy Journal*, 21, 373–376.
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O. I., et al. (2011). A new method for the determination of biogenic amines in cheese by lc with evaporative light scattering detector. *Talanta*, 85, 363–369.
- de las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A. V., & Munoz, R. (2006). PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *Journal of Food Protection*, 69, 2509–2514.
- Roig-Sagués, A. X., Molina, A. P., & Hernández-Herrero, M. M. (2002). Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*, 215, 96–100.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., et al. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11, 621–647.
- Schirone, M., Tofalo, R., Mazzone, G., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2011). Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. *Food Microbiology*, 28, 128–136.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, 675–690.
- Silla Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213–231.
- Stratton, J. E., Hutkin, R. W., & Taylor, S. L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54, 460–470.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & Huisin't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73–84.
- Vale, S., & Glória, M. B. A. (1998). Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chemistry*, 63, 343–348.
- Valsamaki, K., Michaelidou, A., & Polychroniadou, A. (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*, 71, 259–266.



Analytical Methods

A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods

Armağan Önal^{a,*}, Serife Evrim Kepekci Tekkeli^b, Cem Önal^a^a Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 34116 Beyazit, Istanbul, Turkey^b Bezmialem Vakıf University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 34093 Fatih, Istanbul, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2011

Received in revised form 31 May 2012

Accepted 13 October 2012

Available online 8 November 2012

Keywords:

Biogenic amines

Foods

Analytical methods

Review

ABSTRACT

Biogenic amines (BAs) are biologically active molecules which have aliphatic (putrescine, cadaverine, spermine, spermidine), aromatic (tyramine, phenylethylamine) or heterocyclic (histamine, tryptamine) structures. They can be detected in raw and processed foods which are formed and degraded through several pathways during the metabolic processes of animals, plants and microorganisms. The identification and quantitation procedures of BAs in food samples are very important, because BAs are considered as the indicators of food quality and freshness. The determination of BAs are commonly achieved by separation techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis (CE). In this article, analysis of BAs in foods were reviewed from 2007 to present.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biogenic amines (BAs) are organic bases endowed with biological activity, which are frequently found in fermented foods and beverages (Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, Trujillo-Mesa, & Vidal-Carou, 2002). They mainly come from the decarboxylation of amino acids (ten Brink, Damink, Joosten, & Huis in 't Veld, 1990). In low concentrations, biogenic amines are essential for many physiological functions (Teti, Visalli, & McNair, 2002). However, if these compounds are consumed in high quantities, several toxicological problems arise (Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2008; Saaid et al., 2009a; Shalaby, 1996).

BAs are classified as mono- or polyamines (PAs) according to their amine content. PAs are involved in nearly each step of nucleic acid and protein synthesis, because of this every organ of the body requires them for its growth, renewal and metabolism (Shalaby, 1996). Therefore the requirement for PAs increases rapidly in growing tissues. Besides, the unnecessary PA intake causes tumour growth. One of the directions in cancer therapy is to limit the intake of PAs (Moinard, Cynober, & de Bandt, 2005).

Also some of BAs (i.e. putrescine, cadaverine, spermidine and spermine) may react with nitrite and produce volatile nitrosamines which are defined as carcinogenic compounds (Wei et al., 2009). Therefore, formation of nitrosamines in the presence of BAs in a wide range of foods, especially in meat and meat products bring about an additional toxicological risk.

Table 1 shows the chemical properties of the most important BAs occurring in foods (Histamine, putrescine, cadaverine, tyramine, tryptamine, b-phenylethylamine, spermine, and spermidine) such as molecular structure, molecular weight (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), pK value (Kvasnička & Voldřich, 2006; Saaid et al., 2009a; and Takeda et al., 1983).

BAs in foods are of great interest not only due to their toxicity, they can also be used as good indicators of spoilage (De Borja and Rohrer, 2007). For this reason, it is important to monitor BA levels in foods. There are various analytical methods for the quantification of BAs in foods such as high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), capillary electrophoresis (CE) and electro analytical methods.

The presented article describes recent analytical approaches for the analysis of BAs from 2007 to 2011, as a complementary to previous review (Onal, 2007).

2. Analytical methods

2.1. Liquid chromatographic methods

Liquid chromatographic separation methods are popular and useful for selective and sensitive determination of BAs in foods. Various detection techniques are used for the quantitation of BAs in food samples.

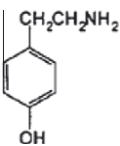
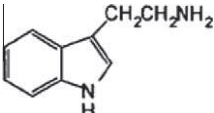
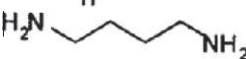
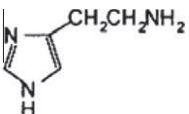
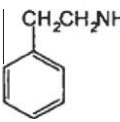
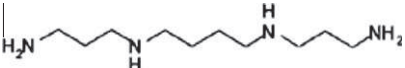
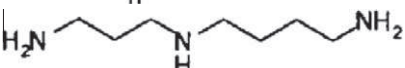
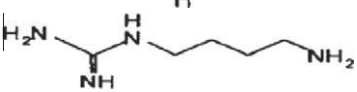
2.1.1. Ultraviolet or fluorescence detection

The most frequently used methods for BA analysis are based on derivatization reactions and separation processes followed by

* Corresponding author. Tel.: +90 2124400000; fax: +90 2124400252.

E-mail address: armaganozkul@yahoo.com (A. Önal).

Table 1Some chemical properties of biogenic amines ^a <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, ^b Kvasnička and Voldřich (2006); Saaid et al. (2009a), and Takeda et al. (1983).

Name	Abbreviation	Molecular formula ^a	Structure formula	pK ^b	Molecular weight ^a
Tyramine	TYR	C ₈ H ₁₁ NO		pK = 9.6	137.2
Tryptamine	TRP	C ₁₀ H ₁₂ N ₂		pK = 10.2	160.2
Putrescine	PUT	C ₄ H ₁₂ N ₂		pK ₁ = 10.8 pK ₂ = 9.4	88.2
Histamine	HIS	C ₅ H ₁₀ N ₃		pK ₁ = 9.8 pK ₂ = 6.0	111.1
Cadaverine	CAD	C ₅ H ₁₄ N ₂		pK ₁ = 11.0 pK ₂ = 9.9	202.2
Phenylethylamine	PEA	C ₈ H ₁₁ N		pK = 10.0	121.2
Spermine	SPM	C ₁₀ H ₂₆ N ₄		pK ₁ = 11.50, pK ₂ = 10.95 pK ₃ = 9.79 pK ₄ = 8.90	202.3
Spermidine	SPD	C ₇ H ₁₉ N ₃		pK ₁ = 9.5, pK ₂ = 10.8 pK ₃ = 11.6	145.3
Agmatine	AGM	C ₅ H ₁₄ N ₄		pK ₁ = 12.5	130.2

ultraviolet (UV) or fluorescence (FL) detection. Derivatization is essential for such kind of detections because most of BAs are lack of chromophore. The derivatization reactions occur via amino group with various types of tagging reagents, such as *o*-phthalaldehyde (OPA), dansyl chloride (dansyl-Cl), 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBF), 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS), 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimide (AQC), *N*-hydroxy-succinimide ester (DMQC-Osu).

2.1.1.1. Ultraviolet detection. Soufleros, Bouloumpasi, Zotou, and Loukou (2007) investigated the BA levels in Greek wines. Samples were analysed by reverse phase (RP)-HPLC with UV detection after pre-column derivatization with dansyl-Cl and subsequent solid-phase extraction (SPE) of the derivatives through C18 cartridges. It was revealed that ninety percent of the wine samples were at acceptable levels of BA content. BA levels of sucuk (Turkish dry fermented sausage) were determined by using HPLC method with diode array detector (DAD) after pre-column derivatization with dansyl-Cl. Putrescine and cadaverine are detected as 93% and 87% of the samples, respectively. Spermine and spermidine were detected in ranges from not detected to 16.4 and from not detected to 10.7 mg kg⁻¹, respectively. Histamine was found to be between 50 and 100 mg kg⁻¹ as 17% of the samples. Tryptamine was detected in the range of 1.2–82.3 mg kg⁻¹. Tyramine contents of all samples were within the acceptable level. Phenylethylamine was found in 17 of the 30 samples and levels in all detected samples were found to be lower than 25 mg kg⁻¹ (Genççelep, Kaban, Aksu, Öz, & Kaya, 2008). BAs except histamine were determined by HPLC after derivatisation with dansyl-Cl conjugates at 55 °C in wine samples. The mobile phase consisted of ethanol, acetonitrile, water, tris buffer at pH 8 and a gradient elution programme was

used. Histamine was determined by a radio-immuno assay method. Amine concentrations were similar in 100 selected high-quality red wines made from seven different cultivars except two ones, which showed significantly higher tryptamine and cadaverine levels. (Konakovsky et al., 2011).

HPLC–UV analysis of BAs were carried out using hollow fibre liquid-phase microextraction (LPME) with in situ derivatization using dansyl-Cl in shrimp sauce and tomato ketchup samples. The samples were made alkaline (pH 9.5) with saturated sodium hydrogen carbonate before derivatization. The derivative was extracted with liquid–liquid extraction (LLE) technique with dihexyl ether (Saaid et al., 2009a). The BAs of Herby cheese were determined with HPLC method as their dansyl derivatives on 30 samples obtained from retail markets in East Anatolia Region, Turkey. The tyramine (range 18.0–1125.5 mg kg⁻¹) and cadaverine varied from not detected to 1844.5 mg kg⁻¹ were the most important BAs. Histamine content was found higher than 100 mg kg⁻¹. The concentration of amines in some cheeses was found much higher than the toxic dose limits. The analysis were performed with HPLC combined to DAD. The samples determined as their dansyl-Cl derivatives. Acetonitrile and ammonium acetate solutions were used as mobile phase with a flow rate 1 ml min⁻¹ (Andiç, Genççelep & Köse, 2010). Pre-column (derivatization with dansyl-Cl) and post-column (derivatization with OPA) derivatization methods for HPLC were modified using column particles of 1.8–3 µm in diameter for the identification and quantification of nine BAs in lean canned tuna and fatty frozen herring by Simat and Dalgaard. The methods were more rapid with reduced amount of eluent compared to the corresponding classical HPLC methods (Simat & Dalgaard, 2011). BA contents were analyzed in boza samples (traditional fermented beverage in Turkey) by HPLC with C18 column after derivatization

with dansyl-Cl at 40 °C for 30 min. Detection was performed at 254 nm. The BA concentrations of boza samples were found as lower than the toxic limits (Cosansu, 2009).

Two HPLC methods, with FL and UV detection, using pre-column OPA and benzoyl chloride derivatization respectively, were developed and compared for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish. Before derivatization with OPA the sample solution was alkalined and waited for 5 min at room temperature. Then the derivative was extracted two times with ethylacetate. However the derivatization process with benzoyl chloride was longer and more complex. Additionally the FL detection found to be more precise and sensitive (Tahmouzi, Khaksar, & Ghasemlou, 2011). A HPLC with DAD and FL detection of simultaneous analysis of amino acids and amines as their *o*-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese samples were proposed. The study includes acidic deproteinization, derivatization and gradient optimization processes, resulting in the identification and quantification of 21 amino acids and 9 amines. Concentration range and recovery were found as 6.25–1000 pM/injection and 100.2%, respectively (Korös, Varga, & Molnar-Perl, 2008). The HPLC–UV method was developed to analyse cheese, clams, salami and beer after a precolumn derivatization with dansyl-Cl. After the derivatization step, a SPE process was applied as sample clean up procedure. C18 column was used for separation and the mobile phase was a mixture of acetonitrile and a solution of ammonium formate (9.0 mM, brought to pH 3.4 with concentrated formic acid at 98%), flowing under gradient elution. The proposed method was validated and compared with the results obtained under the same conditions with mass spectrometric (MS) detection (Mazzucco et al., 2010). Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method with gradient elution using AQC as pre-column derivatizing reagent for the simultaneous determination of twenty primary and secondary BAs in analysis of 58 cheese samples as retailed in Austria. To extract biogenic amines, 10 ml of 0.4 M perchloric acid containing a certain amount of 1,7-diaminoheptane as an internal standard was added to 5 g of fermented soybean paste samples, and the mixture was homogenised for 3 min. The homogenate was centrifuged at 3000g at 4 °C for 10 min. The supernatant was collected and the residue was extracted twice with the same volume of 0.4 M perchloric acid solution. All supernatants were combined and the final volume was adjusted to 25 ml with 0.4 M perchloric acid. The extract was filtered. For chromatographic separation C18 column was used with the mobile phase ammonium acetate and acetonitrile at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The total concentration of BAs in two cheese samples was about 194 mg/100 g. (Mayer, Fiechter, & Fischer, 2011). A HPLC method using dansyl-Cl derivatization was developed to determine the level of different BAs present in 23 traditional fermented soybean paste samples of Doenjang. The mean values of BAs determined in 23 Doenjang samples were found to be 18.37, 82.03, 70.84, 34.24, 47.32, 26.79, 126.66, 74.41 and 244.36 mg%, respectively (Shukla, Park, Kim, & Kim, 2010). A HPLC method for monitoring the content of BA in a nutritious fermented food called sufu was developed. BAs in sufu were extracted with 6% trichloroacetic acid, derivatized with CNBF and purified with SPE and lastly separated by HPLC using gradient elution. Detection was achieved by spectrophotometric UV at 254 nm for 6 types of BAs. The concentrations of BAs detected were below the maximum permissible limits (Tang et al., 2011).

The BA contents were determined using a HPLC method in 62 selected food items commonly consumed in Malaysia. After the aqueous extraction, the samples were derivatised with dansyl chloride before analysing using reversed phase HPLC with UV detection. Mean levels of tryptamine, putrescine, histamine, tyramine and spermidine in eight budu samples were 82.7, 38.1, 187.7, 174.7 and 5.1 mg kg⁻¹, respectively. The main BAs found

in cincalok were putrescine, histamine and tyramine where the mean values were 330.7, 126.1 and 448.8 mg kg⁻¹, respectively (Saaïd, Saad, Hashim, Ali, & Saleh, 2009b). A HPLC method was developed based on pre-column derivatization of the BAs with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBF) in beer samples. BAs in sufu were extracted with 6% trichloroacetic acid, derivatized with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride, separated by HPLC using gradient elution, and detected by spectrophotometric UV at 254 nm. According to the results, each kind of beer examined contained at least three BAs. Putrescine, histamine and tyramine were detected in all samples. Spermidine was detected in 89% of the beers. Spermine, tryptamine and phenylethylamine showed in 78%, 61% and 44% of the beers examined, respectively (Tang et al., 2009). A RP-HPLC method with evaporative light scattering detection (ELSD) was developed for the separation and determination of BAs in cheese. The extraction of homogenised samples performed with SPE technique using C18 cartridges. The mobile phase were composed of acetonitrile/water 20/80 (v/v) mixture containing trifluoroacetic acid (0.05%, v/v) and acetonitrile/water 20/80 containing trifluoroacetic acid (0.35%, v/v). The most abundant amine was histamine, followed, in decreasing order, by tyramine, spermine, putrescine, phenylethylamine and spermidine, for a total amount of 127 mg kg⁻¹ (Restuccia et al., 2011).

2.1.1.2. Fluorescence detection. Harja et al were reported how much the use of selected microorganisms influenced the BA content of young wine produced in the Romanian Minis vineyard. Microvinification experiments for both red and white wines were carried out. Wine samples were analysed via pre-column OPA derivatization and HPLC. The separation was performed using C18 column at 23 °C. A solution of potassium dihydrogenophosphate and disodium hydrogenophosphate adjusted at a pH of 7.2. The sample elution was performed in stages, with a flow rate of 1 mL min⁻¹, and a solvent gradient elution programme was carried out. As a result, there was no difference between the wines produced using selected microorganisms and wines that were produced using the spontaneous microorganisms present on the grape skin (Harja, Dina Stanescu, Eder, Korntheurer, & Schmuckenschlager, 2011). BAs in chicken and pork sausage determined by using RP-HPLC method by gradient elution with fluorescence detection and MS identification. Precolumn labelling was achieved with 10-ethyl-acridine-3-sulfonyl chloride at 50 °C for 15 min (Kang et al., 2011).

HPLC-FL method was described for the detection and quantification of 3 BAs including octopamine, tyramine, phenethylamine in rice wine samples using 2,6-dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (DMQC-Osu) as derivatization reagent, derivatization followed by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction (UDLLME). UDLLME is based on a ternary component solvent system like homogeneous liquid–liquid extraction (HLE) and cloud point extraction. The LODs of BAs were in the range of 0.02–5 ng mL⁻¹ (Huang et al., 2009). An ionic liquid-based ultrasonic-assisted liquid–liquid microextraction (IL-DLLME) method for determination of BAs in beer samples was developed with the combination of HPLC-FL. DMQC-Osu was used for derivatization of BAs. Using an ionic liquid provided some advantages such as the reduction of toxicity, possibility of obtaining more reproducible results and obtaining a directly analysable extract in a short single-step procedure (Huang et al., 2011).

A HPLC method with pre-column derivatization by OPA and NAC mixture was developed for determination of 24 amino acids and BAs in grape juice, wine, honey and physalis fruit. OPA and NAC were used as a mixture so as to provide a stable derivative. Lower limit of quantitation (LLOQ) was found as 100 µg L⁻¹ for tyrosine, phenylalanine, putrescine and cadaverine (Kelly, Blaise, & Larroque, 2010). A RP-HPLC method was developed for analysing of BAs in wines. A pre-column derivatization procedure was

Table 2
The HPLC conditions for the determination of BAs.

Biogenic amines	Food samples	Internal standard/sample pretreatment	Stationary phase	Mobile phase Flow rate (mL/min)	Derivatization/detection	References
HIS ^a , TYR ^b , PUT ^c , PEA ^d , CAD ^e , SPM ^f , SPD ^g	Wine	1,7-Diaminoheptane/SPE with C18 cartridges	ODS-3 column	Gradient elution Eluent A: acetonitrile and eluent B: water	Dansyl chloride derivatization/UV detection at 254 nm	Soufleros et al. (2007)
SPD, SPM, PUT, TYR, TRP ^h , HIS, PEA	Sucuk (Turkish dry fermented sausage)	1,7-Diaminoheptane/0.4 M perchloric acid extraction	ODS2 column	Gradient elution. Eluent A was 0.1 M ammonium acetate and eluent B was acetonitrile	Dansyl chloride derivatization/UV detection at 254 nm	Gençelep et al. (2008)
Isoamylamine, PEA, PUT, CAD, TYR, TRP, SPD	Wines	Diaminoheptane/NaOH and Merck Titrisol® (boric acid/potassium chloride/sodium hydroxide buffer giving a final pH 8)	Polar RP 80A column	Gradient elution Eluent A was ethanol, acetonitrile, water, and Tris buffer pH 8 and eluent B was ethanol, water and Tris buffer pH 8	Dansyl chloride derivatization/UV detection at 220 nm	Konakovsky et al. (2011)
TRP, PUT, CAD, TYR, SPD	Shrimp sauce	–/homogenisation with water	ODS2 column	Acetonitrile–water–2-propanol (63:37:4, v/v/v)	Dansyl chloride derivatization/UV detection at 254 nm	Saaid et al. (2009a)
PUT, TYR, TRP, HIS, PEA, CAD,	Herby cheese	1,7-Diaminoheptane/extraction with 0.4 M perchloric acid	ODS2 column	Gradient elution Eluent A was 0.1 M ammonium acetate and eluent B was Acetonitrile	Dansyl chloride derivatization/UV detection at 254 nm	Andiç et al. (2010)
Agmatine, PEA, CAD, HIS, PUT, SPD, SPM, TRT, TYR	Lean canned tuna and fatty frozen herring	For pre-column derivatization; 1.7 heptanediamine/0.4 M perchloric acid extraction. For post-column derivatization; 1.6-diaminohexane/trichloroacetic acid (TCA)	C18 column	Gradient elution For pre-column derivatization. Eluent A was 0.1 M ammonium acetate and eluent B was acetonitrile. For post-column derivatization; Eluent A was sodium acetate with sodium octanesulfonate (pH 4.5) and eluent B was sodium acetate with octane-sulfonate (pH 4.5) mixed with acetonitrile – ratio 10:3	For pre-column derivatization with dansyl chloride/UV detection at 254 nm. For post-column derivatization <i>o</i> -phthalaldehyde/Fluorimetric detection Ex = 354 nm Em:430 nm	Simat and Dalgaard (2011)
HIS, TRY, TRP, PUT, CAD, PEA	Boza	1,7-Diaminoheptane/trichloroacetic acid (TCA)	C18 column	Gradient elution Eluent A and eluent B were mixture of buffer (pH 8) (consisted of 0.1 M tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (40%), 0.1 M acetic acid (20%)), acetonitrile and water	Dansyl chloride derivatization/UV detection at 254 nm	Cosansu (2009)
PUT, HIS, CAD, TRP	Fish	Metformine/trichloroacetic acid (TCA)	C18 column	Two different elution –Acetonitrile/potassium dihydrogen (50:50) –Methanol/water (50:50)	OPA derivatization UV detector set at 254 nm/Fluorimetric detection Ex = 320 nm Em:523 nm	Tahmouzi et al. (2011)
HIS, TYR, TRP, PEA and 21 amino acid	Cheese	–/1 M HClO ₄	a Thermo Hypersil column	Gradient elution Eluents A: acetonitrile /0.36 M sodium acetate / water (10/5/85 (v/v) adjusted to pH 7. Eluent B: methanol/0.36 M sodium acetate/water (55/8/37 (v/v) adjusted to pH 7. Eluent C: acetonitrile /0.36 M sodium acetate/water (55/5/40 (v/v) adjusted to pH 8, all with acetic acid and Eluent D: acetonitrile	<i>o</i> -Phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenyl methyl chloroformate (OPA/ET/FMOC) derivatization/for the OPA/ET/FMOC derivatives at excitation Ex and Em wavelengths 337 and 454 nm, respectively, and for FMOC-proline and FMOC-hydroxyproline at Ex and Em wavelengths 263 and 313 nm, respectively	Korörs et al. (2008)
CAD, HIS, TYR, TRP and their precursor amino acids	Cheese, clams, salami, and beer	–/0.10 M HCl solution for cheese, clams, salami	C18e column	Gradient elution Eluent A: acetonitrile Eluent B: ammonium formate (9.0 mM, brought to pH 3.40 with concentrated formic acid)	Dansyl chloride derivatization/UV detection at 254 nm and MS detection	Mazzucco et al. (2010)
Primary and secondary biogenic amines	Cheese	Heptylamine /0.6 N perchloric acid	C18 column	Gradient elution Eluent A was 50mM sodium acetate in 1% tetrahydrofuran dissolved in water, adjusted to pH 6.6 by the addition of acetic acid. Eluent B was methanol.	AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate)/UV detection at 254 nm	Mayer et al. (2011)
TRP, PEA, PUT, CAD, HIS, TYR, SPD, SPM, agmatine	Traditional Korean fermented soybean paste samples of Doenjang sufu	1,7-Diaminoheptane /0.4 N perchloric acid	C18 column	Gradient elution Eluent A was ammonium acetate and eluent B was acetonitrile	Dansyl chloride derivatization/UV detection at 254 nm	Shukla et al. (2010)
PUT, HIS, TYR, PEA, SPM, SPD, TRP	Malaysian food	–/SPE with an Oasis MCX cartridges	C18 column	Gradient elution Hac-NaAc buffer (10 mmol/L, pH 6.2) (eluent A) and acetonitrile (eluent B)	4-Chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBF) derivatization/UV detection at 254 nm	Tang et al. (2011)
TRP, PUT, HIS, TYR, SPD	Beer	–/5% TCA	ODS2 column	Acetonitrile: water (67:33, v/v)	Dansyl chloride derivatization/UV detection at 254 nm	Saaid et al. (2009b)
PUT, HIS, TYR, PEA, SPM, SPD, TRP	Beer	–/–	C18 column	Gradient elution Acetonitrile (eluent A) and HAC-NaAc buffer (pH 6.2) (eluent B)	4-Chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBF)/UV detection at 254 nm	Tang et al. (2009)

SPM, SPD, PUT, HIS, TYR, PEA	Cheese	–/SPE on a C18 sorbent	C18 column	Gradient elution For LC–UV analysis, (A) water and (B) acetonitrile For LC–ELSD analysis, (A) acetonitrile/water 20/80 (v/v) mixture containing TFA and (B) acetonitrile /water 20/80 with TFA. The mobile phase was a mixture of methanol–water (60/40, v/v)	Dansyl chloride derivatization/for LC–UV analysis UV detection at 254 nm /ELSD	Restuccia et al. (2011)
Octopamine, TYR, PEA	Rice wine samples	–/trichloroacetic acid (TCA)	XDB–C18 column		DMQC–Osu derivatization/fluorimetric detection Ex = 326 nm Em:412 nm	Huang et al. (2009)
Octopamine, TYR, PEA	Beer	–/IL–DLLME	XDB–C18 column	Methanol–water (60/40, v/v)	DMQC–Osu derivatization/fluorimetric detection Ex = 326 nm Em:412 nm	Huang et al. (2011)
Tyrosine, phenylalanine, putrescine and cadaverine and their precursor amino acids	Grape juice, wine, honey and physalis fruit	–/–	Equisil® column	Gradient elution Eluent A 95% 0.05 M sodium acetate buffer, pH 6.5 and 5% methanol, Eluent B methanol–acetonitrile 70–30	o-Phthalaldehyde/fluorimetric detection Ex = 330 nm Em:440 nm.	Kelly et al. (2010)
HIS, PUT, TYR, CAD	Wines	2-Amino heptanoic acid/Solid-phase extraction (SPE)	C18 column	Gradient elution Eluent A was a solution of 140 mM sodium acetate trihydrate and 17 mM TEA adjusted to pH 5.05. Eluent B was methanol	AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate)/Fluorimetric detection Ex = 250 nm Em:395 nm	Peña-Gallego et al. (2009)
HIS, TYR, CAD, SPD, SPM	Wine, fish, cheese, and dry fermented sausage	–/homogenisation with 0.6 M perchloric acid	C18 column	Gradient elution Eluent A: a solution of sodium acetate and sodium octanesulphonate adjusted to pH 4.8 with acetic acid, and the eluent B: a mixture of acetonitrile (6.6:3.4), where solvent B was a solution of sodium acetate and sodium octanesulphonate adjusted to pH 4.5 with acetic acid	Post column OPA derivatization/fluorimetric detection Ex:340 nm Em:445 nm	Latorre-Moratalla et al. (2009)
HIS, TYR, TRP, PEA, CAD, PUT, SPD, SPM	Donkey milk	1,7-Diaminoheptane/protein precipitation	C18 column	Gradient elution Eluent A water (W) and eluent B acetonitrile	Dansyl chloride derivatization/MS detection –/MS detection	La Torre et al. (2010)
Agmatine, urocanic acid, HIS, PEA, PUT, TRP, TYR	Canned tuna and fro zen tuna	Metformin/matrix solid-phase dispersion	UPLC BEH HILIC column	Gradient elution Eluent A was ammonium formate buffer, and eluent B was acetonitrile.		Self et al. (2011)
PUT, CAD, HIS, TRP, TYR, PEA, ethanolamine and cycloheptylamine	Wines	–/–	C18 column	Gradient elution acetic acid aqueous solution (eluent A) and methanol (eluent B)	1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate (NQS)/MS detection	García-Villar et al. (2009)
Agmatine, PEA, TYR, PUT, CAD, HIS, TRP, SPD, SPM, norepinephrine, dopamine,	Cheonggukjang (fermented Korean traditional food made from soybeans)	1,7-Diaminoheptane/0.1 N HCl	XDB–C8 column	Gradient elution eluent A was a solution of Oformic acid in ammonium acetate (pH 3.5) and eluent B was 0.1% formic acid in ACN.	Dansyl chloride derivatization/TMS detection	Lee et al. (2011)

^a HIS: Histamine, ^b TYR: Tyramine, ^c PUT: Putrescine, ^d PEA: polyethylamine, ^e CAD: Cadaverine, ^f SPM: Spermine, ^g SPD: Spermidine, ^h TRP: Tryptamine.

carried out with the reagent AQC in alkaline medium. Before derivatization, SPE applied to wine samples with mixed-mode ion-exchange resins. LOQ were lower than 0.16 mg L^{-1} for all the amines and the linear range of concentration was $0.16\text{--}8 \text{ mg L}^{-1}$ for putrescine, cadaverine and tyramine, and up to 10 mg L^{-1} for histamine (Peña-Gallego, Hernández-Orte, Cacho, & Ferreira, 2009). The ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) method coupled with an on-line OPA postcolumn derivatization were described to determine 12 BAs and polyamines in different food matrixes (wine, fish, cheese, and dry fermented sausage) in a single chromatographic run on a 7-min elution programme. C18 column was used at 42°C while the post-column reaction equipment was kept at room temperature. Fluorimetric detection at 340 nm for excitation and 445 nm for emission was applied. Detection limits were found lower than 0.2 mg L^{-1} and a determination limit falling below 0.3 mg L^{-1} for all amines (Latorre-Moratalla et al., 2009).

2.1.2. Mass spectrophotometric detection

HPLC atmospheric pressure chemical ionisation MS (HPLC–APCI–MS) method was developed for the determination of 8 BAs in 13 donkey milk samples. After donkey milk treated to remove proteins, pre-column dansylation of the amines were carried out. The derivatization was carried out in the dark for an hour at 50°C . HPLC was used in RP mode. Separation was performed with a flow rate of 1 mL min^{-1} and putrescine, spermine and spermidine were eluted in less than 20 min. (La Torre, Saitta, Giorgia Potorti, Di Bella, & Dugo, 2010). Ultrahigh-performance hydrophilic interaction chromatography (UHPLC–HILIC) coupled with orbitrap MS for detection were developed to determinate eight BA compounds from canned and frozen tuna. Tuna samples were extracted with matrix solid-phase dispersion using CN-silica sorbent and eluted with a mixture of aqueous ammonium formate buffer and acetonitrile. Instrumental conditions include an injection volume of $5.0 \mu\text{L}$, a column temperature of 30°C , and a flow rate of 0.75 mL min^{-1} . Mobile phase was ammonium formate buffer and acetonitrile (Self, Wu, & Marks, 2011).

A HPLC–MS method for determining BAs in Spanish wines of four producing regions was developed. NQS used as a pre-column labeling agent. Derivatization was performed at 65°C and pH 9.2 for 5 min. The separation was achieved by a C18 column using an elution gradient based on increasing the percentage of methanol. Acetic acid aqueous solution and methanol were used as mobile phase.

Derivatives was ionised in positive mode and detected by selected ion monitoring. The results showed that putrescine was the most abundant BA with concentrations ranging from 5 to 45 mg L^{-1} . Histamine and tyramine concentrations were of $2\text{--}15 \text{ mg L}^{-1}$. Cadaverine and phenylethylamine concentrations were present at lower level below 1 mg L^{-1} (García-Villar, Hernández-Cassou, & Saurina, 2009). An ultra high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) method describes a rapid and reliable procedure to determine 12 dansylated BAs in cheonggukjang (fermented Korean traditional food made from soybeans) in less than 7 min of chromatographic elution with C8 column. Mobile phase consisted of 0.1% formic acid in 20 mM ammonium acetate (pH 3.5) and 0.1% formic acid in acetonitrile. The injection volume was $5 \mu\text{L}$. Detection was carried out with positive ionisation (Lee, Eom, Yoo, Cho, & Shin, 2011).

Chromatographic conditions of the methods described above listed in Table 2.

3. Discussion

BAs are important nitrogenous compounds in vegetable, microbial and animal cells. Because when consumed in excessive

amounts, they can cause severe toxicological effects in human beings. The identification and quantitation of these compounds in food samples become a significant research and development area. Most BA analysis are carried out by HPLC. Recently good results are also provided by UPLC. UPLC is a new technique which works with the same principles of HPLC. Besides UPLC is faster, more sensitive and has higher resolution. However this instrument is a highly prized laboratory equipment that is not yet widely available in routine laboratories. CE and GC are uncommon techniques for BA analysis in food samples.

As BAs are low volatile compounds and lack of chromophores, most of BA analysis are based on derivatization before UV or FL detection. FL offers higher sensitivity than UV detection. The FL derivatization methods can be mainly divided into two categories: pre- (the derivatization is carried out before the chromatographic separation) and post-column (the derivatization is carried out after the chromatographic separation) derivatization methods. Most FL derivatizing reagents have been mostly used for pre-column derivatization. The pre-column derivatization technique is used more frequently than the post-column derivatization because of providing more sensitive detection. Various reagents have been trialed to derivatize BAs so far. The following reagents have already been the most useful ones so as to provide the sensitive determination: Dansyl-Cl, OPA, DMQC-Osu, CNBF, NQS, AQC.

Chromatographic methods coupled with MS detection are very popular among many researchers, because of its higher sensitivity than conventional methods. It provides the ability to identify the structure of the analytes and also has high resolution. However reported applications of these methods for food measurements are limited because, chromatographic instrumentation coupled with MS detection is very high priced and requires a speciality to operate.

LC–ELSD is a feasible alternative for the determination of BAs in food samples. ELS detection is sensitive for the analytes which is stable and do not evaporate during evaporation of the solvent or mobile phase. This detector has some advantages such as does not requiring any pretreatment processes like derivatizing and this prevents researchers from time consuming analyses. But so as to achieve the most sensitive detection, the working conditions should be optimised by trying different conditions attentively.

The pre-treatment procedure of food samples is very important in BA analysis. The most important part of the procedure is the separation of BAs from complex matrices. LLE, SPE are widely used techniques for that step. For LLE, large volumes of toxic solvents are required, sometimes emulsions occur during extraction and the recovery values are generally lower than gained by SPE which is the technique that mainly depends on C18 or other sorbents and ion exchange materials. SPE applications are conducted in two different forms; automated which is expensive and manual which is tedious and time consuming. Ultrasonic-assisted extraction methods proved to be a fast and efficient alternative to conventional extraction techniques. Ionic liquids (ILs), are composed of organic cations and inorganic or organic anions nearly at the room temperature, have the characteristics of high thermal stability, non-flammability and good solubility for inorganic and organic compounds. Currently, there has been a growing interest in the use of porous hollow fibre based LPME. This technique is simple and inexpensive, with the further advantage that the fibre is disposable after usage due to its low cost, thus overcoming carry-over problems. Moreover LPME has high recovery, provides shorter analysis time. The most significant advantage is the small amount of organic solvent consumption.

At the present day, development and generalisation the usage of new analytical methods, which are validated and provide rapid, accurate, precise and sensitive determinations of BAs in food samples, have been increasingly gaining importance.

References

- Andić, S., Genççelep, H., & Köse, S. (2010). Determination of biogenic amines in 409 Herby cheese. *International Journal of Food Properties*, 13, 1300–1314.
- Cosansu, S. (2009). Determination of biogenic amines in a fermented beverage, boza. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(2), 54–58.
- De Borba, B. M., & Rohrer, J. S. (2007). Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography, A*, 115, 22–30.
- García-Villar, N., Hernandez-Cassou, S., & Saurina, J. (2009). Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A*, 1216, 6387–6393.
- Genççelep, H., Kaban, G., Aksu, M. İ., Öz, F., & Kaya, M. (2008). Determination of biogenic amines in sucuk. *Food Control*, 19, 868–872.
- Harja, F., Dina Stanescu, M., Eder, R., Korntheurer, K., & Schmuckenschlager, M. (2011). Influence of selected microorganisms compared to naturally occurring microorganisms on biogenic amines content of young wines from minis vineyard. *UPB Scientific Bulletin, Series B*, 73, 115–122. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Huang, K.-J., Jin, C.-X., Song, S.-L., Wei, C.-Y., Liu, Y.-M., & Li, J. (2011). Development of an ionic liquid-based ultrasonic-assisted liquid–liquid microextraction method for sensitive determination of biogenic amines: Application to the analysis of octopamine, tyramine and phenethylamine in beer samples. *Journal of Chromatography, B*, 879, 579–584.
- Huang, K. J., Wei, C. Y., Liu, W. L., Xie, W. Z., Zhang, J. F., & Wang, W. (2009). Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for sensitive determination of biogenic amines in rice wine samples. *Journal of Chromatography, A*, 1216, 6636–6641.
- Kang, L., You, J. M., Sun, Z. W., Wang, C. Y., Ji, Z. Y., Gao, Y. P., et al. (2011). LC determination of trace biogenic amines in foods samples with fluorescence detection and MS identification. *Chromatographia*, 73, 43–50.
- Kelly, M. T., Blaise, A., & Larroque, M. (2010). Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey. *Journal of Chromatography, A*, 1217, 7385–7392.
- Konakovsky, V., Focke, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Schmid, R., Scheiner, O., Moser, P., et al. (2011). Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines. *Food Additives and Contaminants*, 28(4), 408–416.
- Körös, A., Varga, Z., & Molnar-Perl, I. (2008). Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*, 1203, 146–152.
- Kvasnička, F., & Voldřich, M. (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography, A*, 1103, 145–149.
- La Torre, G. L., Saitta, M., Giorgia Potorti, A., Di Bella, G., & Dugo, G. (2010). High performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for sensitive determination of bioactive amines in donkey milk. *Journal of Chromatography, A*, 1217, 5215–5224.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2009). Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of Chromatography, A*, 1216, 7715–7720.
- Lee, S., Eom, H.-S., Yoo, M., Cho, Y., & Shin, D. (2011). Determination of biogenic amines in Cheonggukjang using ultra high pressure liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 123–129.
- Mayer, H. K., Fiechter, G., & Fischer, E. (2011). A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography, A*, 1217, 3251–3257.
- Mazzucco, E., Gosetti, F., Bobba, M., Marengo, E., Robotti, E., & Gennaro, M. C. (2010). High-performance liquid chromatography–ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. Applications in food chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 127–134.
- Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: Metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24, 184–197.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, 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.
- Onal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103(4), 1475–1486.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction: A comparative study. *Journal of Chromatography, A*, 1216, 3398–3401.
- Pérez-Serradilla, J. A., & Luque de Castro, M. D. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Journal Food Chemistry*, 111, 447–456.
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O. I., et al. (2011). A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. *Talanta*, 85, 363–369.
- Saad, M., Saad, B., Ali, A. S., Saleh, M. I., Basheer, C., & Lee, H. K. (2009a). In situ derivatization hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of biogenic amines in food samples. *Journal of Chromatography, A*, 1216(27), 5165–5170.
- Saad, M., Saad, B., Hashim, N. H., Ali, A. S. M., & Saleh, M. I. (2009b). Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry*, 113, 1356–1362.
- Self, R. L., Wu, W. H., & Marks, H. S. (2011). Simultaneous quantification of eight biogenic amine compounds in tuna by matrix solid-phase dispersion followed by HPLC–orbitrap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 5906–5913.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, 675–690.
- Shukla, S., Park, H. K., Kim, J. K., & Kim, M. (2010). Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1191–1195.
- Simat, V., & Dalgaard, P. (2011). Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 399–406.
- Souflieros, E. H., Bouloumpasi, E., Zotou, A., & Loukou, Z. (2007). Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, 101, 704–716.
- Tahmouzi, S., Khaksar, R., & Ghasemlou, M. (2011). Development and validation of an HPLC–FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry*, 126, 756–761.
- Takeda, Y., Samejima, K., Nagano, K., Watanabe, M., Sugeta, H., & Kyogoku, Y. (1983). *European Journal of Biochemistry*, 130, 383–389.
- Tang, T., Qian, K., Shi, T., Wang, F., Li, J., Cao, Y., et al. (2011). Monitoring the contents of biogenic amines in sufu by HPLC with SPE and pre-column derivatization. *Food Control*, 22, 1203–1208.
- Tang, T., Shi, T., Qian, K., Li, P., Li, J., & Cao, Y. (2009). Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, B*, 877, 507–512.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & Huis in 't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal Food Microbiology*, 11, 73–84.
- Teti, D., Visalli, M., & McNair, H. (2002). Analysis of polyamines as markers of (patho) physiological conditions. *Journal of Chromatography, B*, 781, 107–149.
- Wei, F., Xu, X., Zhou, G., Zhao, G., Li, C., Zhang, Y., et al. (2009). Irradiated Chinese Rugao ham: Changes in volatile N-nitrosamine, biogenic amine and residual nitrite during ripening and post-ripening. *Meat Science*, 81, 451–455.

ANEXO 2

LISTA DE ABREVIATURAS

2014

AA: Aminoácido

AB: Aminas Biógenas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNr: ADN ribosómico

a_w : actividad de agua

AOAC: association of analytical communities

ATP: Adenosín Trifosfato

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

CSIC: Comisión Sectorial de Investigación Científica

CAD: Cadaverina

DAO: Diamino oxidasa

DE: Desvío Estándar

EFSA: European Food Safety Agency

FAO: Food and Agriculture Organization

GRAS: Generally Recognized As Safe

GC: Cromatografía Gaseosa

hdc: histidina descarboxilasa

HIS: Histamina

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods

M17: M17 (medio de cultivo lácticas)

MAO: Monoamino oxidasa

MRS: Man, Rogosa y Sharpe (medio de cultivo)

m.o.: microorganismos

OF: O.F. Medio Basal de Hugh & Leifson OK

LISTA DE ABREVIATURAS

2014

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA: Plate Count Agar

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PHE: Feniletilamina

ppm: partes por millón

PUT: Putrescina

QPS: Qualified Presumption of Safety

rpm: revoluciones por minuto

RBN: Reglamento Bromatológico Nacional

TLC: Cromatografía en capa fina

TYR: Tiramina

tyrdc: tirosina descarboxilasa

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alta presión

WHO: World Health Organization

%H: Porcentaje de humedad

ANEXO 3

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

2014

Figura 1. Clasificación de las aminas según su estructura química.....	6
Figura 2. Histamina.....	6
Figura 3. Efectos tóxicos de las aminas biógenas y factores potenciadores...7	
Figura 4. Diagrama elaboración del queso.....	12
Figura 5. Fermentación homoláctica y heteroláctica.....	15
Figura 6. Fermentación de disacáridos, lactosa.....	15
Figura 7. Rutas metabólicas de compuestos del queso.....	17
Figura 8. Resumen de la proteólisis y catabolismo de aminoácido en queso durante la maduración.....	18
Figura 9. Resumen del sistema proteolítico de <i>Lactococcus</i>	19
Figura 10. Potencial de acidificación.....	27
Figura 11. Colonias BAL, MRS.....	38
Figura 12. Colonias BAL, M17.....	38
Figura 13. Reconocimiento bioquímico de aislamientos BAL.....	39
Figura 14. Ensayo de potencial de acidificación.....	45
Figura 15. Placa ensayo de lipólisis.....	45
Figura 16. Placas ensayo de proteólisis para diferentes aislamientos.....	46
Figura 17. Ajuste de temperatura de annealing (Tm).....	48
Figura 18. Tiempos de retención para picos de histamina, estándar interno y tiramina obtenidos con HPLC.....	53

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

2014

Tabla 1. Aminas Biógenas en alimentos y sus efectos farmacológicos.....	6
Tabla 2. Muestras utilizadas.....	23
Tabla 3. Quesos artesanales elaborados con distintos fermentos.....	24
Tabla 4. Recuentos de microorganismos aerobios totales, BAL mesófilas y termófilas en aerobiosis y anaerobiosis.....	36
Tabla 5. Recuentos de coliformes totales (CT) en quesos artesanales experimentales al avanzar la maduración.....	37
Tabla 6. Identificación de aislamientos.....	40
Tabla 7. Identificación de aislamientos obtenidos de diferentes muestras por método molecular.....	41
Tabla 8. Potencial de desarrollo de acidez.....	42
Tabla 9. Potencial de desarrollo de acidez en aislamientos obtenidos de diferentes muestras.....	43
Tabla 10. Propiedades tecnológicas de interés en aislamientos obtenidos de diferentes muestras.....	44
Tabla 11. Propiedades tecnológicas de interés en aislamientos obtenidos de diferentes muestras de quesos artesanales y liofilizado.....	44
Tabla 12. Potencial formador de AB para diferentes aislamientos de leche cruda.....	46
Tabla 13. Potencial formador de AB para diferentes aislamientos obtenidos de muestras de quesos artesanales.....	47
Tabla 14. Temperaturas de hibridación óptimas por primer.....	47
Tabla 15. Análisis de Tm para los diferentes pares de cebadores.....	49
Tabla 16. Potencial formador de AB histamina y tiramina por método molecular.....	50
Tabla 17. Cuantificación de tiramina e histamina para quesos frescos artesanales experimentales y comerciales.....	51
Tabla 18. Cuantificación de tiramina e histamina para aislamientos obtenidos de quesos artesanales experimentales y liofilizado comercial.....	52

ANEXO 4

MEDIOS

2014

MRS

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Proteosa peptona Nº 3	10.0	Suspender 64 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
Extracto de carne	8.0	
Extracto de levadura	4.0	
Glucosa	20.0	
Monoleato de sorbitán	1 ml	
Fosfato dipotásico	2.0	
Acetato de sodio	5.0	
Citrato de amonio	2.0	
Sulfato de magnesio	0.2	
Sulfato de manganeso	0.05	
Agar	13.0	
pH final: 6.4 ± 0.2		

M17

Solución de lactosa al 10% (W/V)

Peptona 1 (digerido tríptico de caseína) 2,50 g

Peptona 2 (digerido péptico de carne) 2,50 g

Peptona 3 (digerido papaínico de soya) 5,00 g

Extracto de levadura 2,50 g

Extracto de carne 5,00 g

Sal disódica del β - glicerofosfato ($C_3H_7O_6PNa_2$) 9,00 g

Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0,25 g

Ácido ascórbico 0,50 g

Agar bacteriológico 15,0 g

Agua 950,0 mL

MEDIOS

2014

OF Modificado

Peptona 2,00 g

Glucosa 10 g

Azul de bromotimol 0,03 g

NaCl 5 g

K₂HPO₄ 0,3 g

Agar 15 g

Agua 1 L

Milk agar

Tryptona 5 g

Extracto de levadura 2,5 g

Dextrosa 1 g

Leche en polvo descremada 1 g

Agar 12,5 g

Agua 1 L

Medio lipólisis

Beef extract 3 g

Trypton 5 g

NaCl 4 g

Lecithin 1 g

Olive oil 10 g

Agar 15 g

H₂O 1 L

Rhodamina B 5 mL al 0,1%

MEDIOS

2014

PCA

Extracto de levadura 2.5 g

Dextrosa 1 g

Triptona 5 g

Agar 15 g

Agua 1 L

pH 7

TSA

Triptona 15 g

Peptona de Soya 5 g

NaCl 5 g

Agar 15 g

Agua 1 L

Medio Niven's modificado

Triptona 0,5%

Extracto de levadura 0,5%

NaCl 0,5%

CaCO₃ 0,1%

Purpura de bromocresol 0,006%

Aminoácido 0,25% (sal de tirosina 0,20% por baja solubilidad)

Agar 3%

pH 5,3