

Biogeni amini u siru

Herljević, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:913397>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

BIOGENI AMINI U SIRU

DIPLOMSKI RAD

Dora Herljević

Zagreb, srpanj, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

BIOGENI AMINI U SIRU

DIPLOMSKI RAD

Dora Herljević

Mentor: doc. dr. sc. Milna Tudor Kalit

Zagreb, srpanj, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Dora Herljević**, JMBAG 0248040829, rođen/a dana 01.09.1993. u Rijeci, izjavljujem
da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

BIOGENI AMINI U SIRU

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Dore Herljević**, JMBAG 0248040829, naslova

BIOGENI AMINI U SIRU

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc. dr. sc. Milna Tudor Kalit mentor

2. prof. dr. sc. Samir Kalit član

3. doc. dr. sc. Ivica Kos član

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Milni Tudor Kalit, na predloženoj temi, vremenu, trudu, stručnoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Iskreno hvala mojim dragim prijateljicama Karmen, Katarini i Barbari koje su uvijek bile tu uz mene i vjerovale u moj uspjeh kada ni sama nisam.

Posebno hvala sestri Marti i baki Katarini na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju kroz čitavo moje vrijeme studiranja.

*I na kraju, najveću zaslugu za sve ono što sam postigla pripisujem svome **ocu** i svojoj **majci**, bez čije ljubavi, razumijevanja i podrške moje studiranje ne bi bilo moguće. Hvala Vam od srca.*

Ovaj rad posvećujem Vama!

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada.....	1
2. Biogeni amini.....	2
2.1. Bioaktivni amini.....	3
2.2. Toksični učinak	4
2.3. Mehanizam detoksifikacije.....	6
2.4. Biogeni amini u hrani.....	7
3. Biogeni amini u siru	11
3.1. Mikroorganizmi sa sposobnošću tvorbe biogenih amina	13
3.2. Mehanizam nastajanja biogenih amina	16
3.3. Čimbenici koji utječu na akumulaciju biogenih amina.....	17
3.4. Mjere za kontrolu	21
3.5. Određivanje biogenih amina u siru	24
4. Zaključak	28
5. Popis literature	29
6. Prilog	32
Životopis	33

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Dora Herljević**, naslova

BIOGENI AMINI U SIRU

Cilj ovog rada je opisati mehanizam nastajanja biogenih amina tijekom zrenja sira, čimbenike koji utječu na razinu njihove akumulacije u siru, prirodne mehanizme detoksifikacije u ljudskom organizmu te mjere za kontrolu njihovog nastajanja u proizvodnji i tijekom zrenja sira. Biogeni amini nastaju tijekom zrenja sira dekarboksilacijom slobodnih aminokiselina uslijed mikrobne aktivnosti. Imaju biološki aktivno djelovanje jer su prekursori u sintezi hormona, proteina i nukleinskih kiselina te imaju ulogu u imunološkom odgovoru. Međutim, uneseni hranom u previsokim koncentracijama, mogu izazvati toksičan učinak sa simptomima poput hipertenzije, tahikardije, migrene, urtikarije i dr. Biogeni amini utječu na kvalitetu i sigurnost sira jer je njihov veći sadržaj utvrđen u sirevima proizvedenima iz sirovog mlijeka uz određene uvjete zrenja.

Ključne riječi: biogeni amini, sir, zrenje, dekarboksilacija, slobodne aminokiseline, mikroorganizmi

Summary

Of the master's thesis – student **Dora Herljević**, entitled

BIOGENIC AMINES IN CHEESE

The aim of this thesis is to describe the formation mechanism of biogenic amines during cheese ripening, factors affecting the level of their accumulation in the cheese, natural detoxification mechanisms in the human body and measures to control their formation during production and ripening of the cheese. Biogenic amines are formed during cheese ripening by decarboxylation of free amino acids due to microbiological activity. They are biologically active as they are precursors in the synthesis of hormones, proteins and nucleic acids, and have a role in the immune response. However, food containing high concentrations of these compounds can cause toxic effects with symptoms such as hypertension, tachycardia, migraine, urticaria and other, when consumed. Biogenic amines affect the quality and safety of cheese, as their higher content is determined in cheese produced from raw milk with certain ripening conditions.

Keywords: biogenic amines, cheese, ripening, decarboxylation, free aminoacids, microorganisms

1. Uvod

Na našem se tržištu pojavljuju razne vrste sireva, od onih tradicionalne pa do industrijske proizvodnje, od sirovog ili toplinski obrađenog mlijeka, s ili bez upotrebe starter kultura bakterija, kvasaca ili plijesni. Svaki tip proizvodnje u sirarstvu donosi specifične izazove, pa i određene mikrobiološke rizike. Sir je glavni fermentirani mliječni proizvod koji sadrži potencijalno štetne koncentracije biogenih amina, posebice tiramina, histamina i putrescina (Sanli i Senel 2015.). Biogeni amini su nehlapljive organske baze male molekulske mase, mogu biti alifatske, aromatske ili heterocikličke građe na koju je vezana jedna ili više amino skupina, a broj amino skupina određuje da li je biogeni amin monoamin, diamin ili poliamin.

Biogeni amini imaju biološki aktivno djelovanje zbog toga što sudjeluju u regulaciji niza fizioloških procesa, odnosno, prekursori su u sintezi hormona, proteina, nukleinskih kiselina te imaju ulogu u imunološkom odgovoru čovjeka. Međutim, ukoliko su uneseni u organizam u previsokim koncentracijama mogu izazvati toksičan učinak; dolazi do mučnine, glavobolje, osipa, promjena u krvnom tlaku i ostalo (Herrero-Fresno i sur. 2012.). Ovi problemi su posebice izraženi kod osoba koje imaju neučinkovit sustav detoksifikacije radi genetskih ili inhibitornih učinaka, zbog primjerice konzumacije alkohola ili lijekova (Linares i sur. 2011.). Glavni preduvjeti koji utječu na razinu biogenih amina u hrani su prisutnost slobodnih aminokiselina kao supstrata, mikroorganizmi koji tvore enzim dekarboksilazu, a koji mogu biti prirodno prisutni u hrani i/ili naknadno dodani te okolišni uvjeti koji omogućuju rast mikroorganizama, a samim time i prisustvo enzima dekarboksilaza (Loizzo i sur. 2013.).

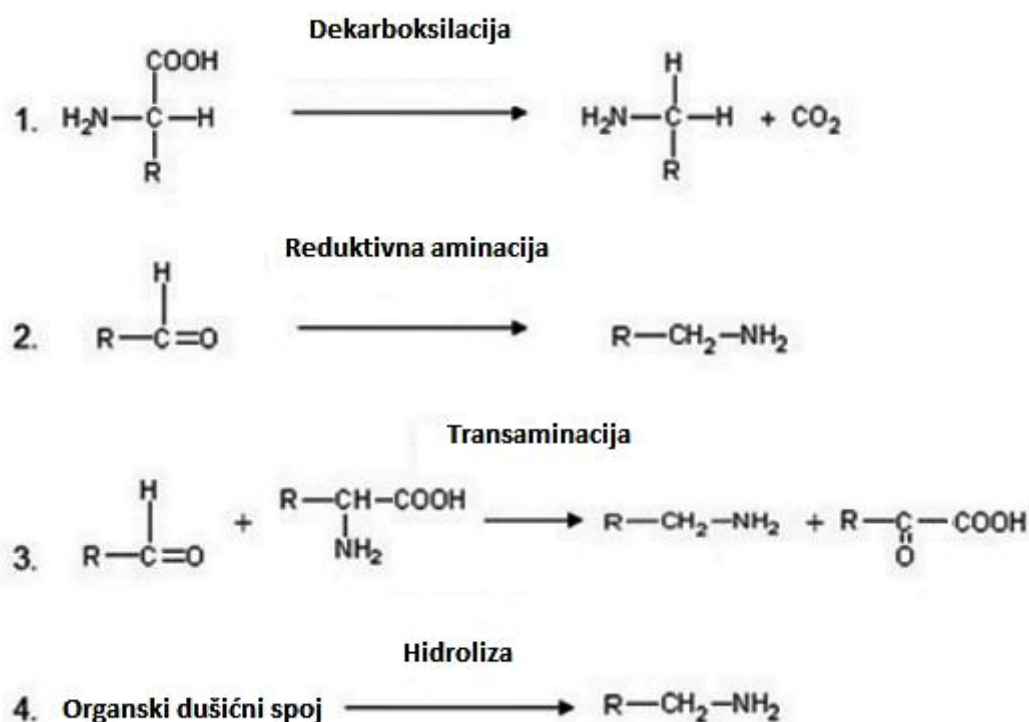
1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je opisati mehanizam nastajanja biogenih amina tijekom zrenja sira, čimbenike koji utječu na razinu njihove akumulacije u siru, prirodne mehanizme detoksifikacije u ljudskom organizmu te mjere za kontrolu njihovog nastajanja u proizvodnji i tijekom zrenja sira.

2. Biogeni amini

Biogeni amini (BA) su nehlapljive dušične organske baze male molarne mase koji nastaju dekarboksilacijom slobodnih aminokiselina, reduktivnom aminacijom aldehida i ketona, transaminacijom između aldehida i aminokiselina te hidrolitičkom razgradnjom organskih dušičnih spojeva (**Slika 2.1.**) (Bäumlisberger i sur. 2015.). Dio su metabolizma biljaka, životinja i ljudi, a prirodno su prisutni u raznim vrstama namirnica poput povrća, voća, mesa i ribe, dok je njihovo prisustvo u fermentiranim proizvodima kao što su vino, pivo, kobasice i sir, prvenstveno produkt mikrobiološke aktivnosti. Osim navedenog, mogu nastati i pod utjecajem prirodno prisutnih enzima u hrani i piću (Silla Santos 1996.). Upravo zbog toga što nastaju kao produkt aktivnosti živih organizama se nazivaju biogeni amini (grč. *bios*- život, *genesis*- postojati).

Postoji nekoliko načina klasifikacije biogenih amina (**Tablica 2.1.**). Prema svojoj kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na: alifatske (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatske (tiramin, feniletilamin) i heterocikličke (histamin, triptamin). A s obzirom na broj aaminskih skupina dijele se na: monoamine (tiramin, feniletilamin, histamin, triptamin), diamine (putrescin, kadaverin) i poliamine (spermin, spermidin) (Linares i sur. 2011.). Monoamini su široko rasprostranjeni u prirodi, dok se putrescin i poliamini spermin i spermidin nalaze u biljkama i životinjama, a mikroorganizmi u svojoj stanici sadrže putrescin i spermidin (Shalaby 1996.). Većina biogenih amina je dobila naziv prema odgovarajućoj aminokiselini od koje je sintetizirana.



Slika 2.1. Prikaz nastanka biogenih amina
(Prilagođeno prema: Bäumlisberger i sur. 2015.)

Najvažniji biogeni amini nađeni u hrani i piću su histamin, tiramin, putrescin, kadaverin, triptamin i feniletilamin, a koji nastaju dekarboksilacijom histidina, tirozina, ornitina, lizina, triptofana i fenilalanina (Loizzo i sur. 2013.). Spermin i spermidin su prisutni u nešto manjim koncentracijama, a mogu se sintetizirati iz arginina ili iz ornitina. Prisutnost biogenih amina može poslužiti kao indikator nepoželjne aktivnosti mikroorganizama, kvarenja hrane ili pogrešaka u proizvodnji (Linares i sur. 2011.). Međutim, to ne mora uvijek biti slučaj s obzirom da nisu svi mikroorganizmi dekarboksilaza-pozitivni.

Tablica 2.1. Karakteristike glavnih biogenih amina u hrani i piću
(Izvor: Nunez i Medina 2016.)

Biogen amin	IUPAC-ovo ime	Molekulska formula	Molarna masa (g/mol)	Klasifikacija
Tiramin	4-(2-aminoetil)fenol	C ₈ H ₁₁ NO	137.18	Monoamin, aromatski
Feniletilamin	Feniletan-2-amin	C ₈ H ₁₁ N	121.18	Monoamin, aromatski
Histamin	2-(1H-imidazol-4-il)etanamin	C ₅ H ₉ N ₃	111.15	Monoamin, heterociklički
Triptamin	2-(1H-indol-3-il)etanamin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	160.22	Monoamin, heterociklički
Kadaverin	Pentan-1,5-diamin	C ₅ H ₁₄ N ₂	102.18	Diamin, alifatski
Putrescin	Butan-1,4-diamin	C ₄ H ₁₂ N ₂	88.15	Diamin, alifatski
Spermidin	<i>N</i> -(3-aminopropil)butan-1,4-diamin	C ₇ H ₁₉ N ₃	145.25	Poliamin, alifatski
Spermin	<i>N-N'</i> -bis(3-aminopropil)butan-1,4-diamin	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	202.34	Poliamin, alifatski

2.1. Bioaktivni amini

Bioaktivni amini su biološki aktivni amini koji imaju pozitivan utjecaj na ljudski organizam, sudjeluju u važnim metaboličkim i fiziološkim funkcijama. Zajedno sa svojom biološkom ulogom kao izvorom dušika, prekursori su u sintezi hormona, alkaloida, nukleinskih kiselina, proteina i antikancerogenih spojeva (Silla Santos 1996.).

Mogu biti psihoaktivni ili vazoaktivni; psihoaktivni amini utječu na živčani sustav gdje sudjeluju kao neurotransmiteri, dok vazoaktivni amini djeluju na krvožilni sustav (Glória 2005.). Dokazani su povoljni učinci agmatina, kao neurotransmitera i neuromodulatora, na ljudsko zdravlje. On stimulira oslobađanje inzulina i djeluje inhibitorno na razvoj tumora u organizmu. Neuroaktivni amini serotonin, triptamin i feniletilamin su uključeni u regulaciju važnih funkcija poput spavanja, kontrole gladi i raspoloženja (Moreira i sur. 2018.). Važnu ulogu u organizmu ima i histamin koji sudjeluje u održavanju živčanog sustava i kontroli

krvnog tlaka. Primjerice, feniletilamin, triptamin i tiramin uzrokuju povećanje krvnoga tlaka, a histamin ga snižuje. Histamin se u velikim količinama nalazi u mastocitima (stanicama imunološkog sustava koje nastaju u koštanoj srži te cirkulacijom dolaze u tkiva) i bazofilima (leukociti), međutim, njegov učinak je vidljiv tek nakon što se odvijaju određene reakcije u tijelu. To je slučaj prilikom alergijskih reakcija gdje se histamin oslobađa u krvotok i služi kao pokretač (medijator) akutnih alergijskih odgovora kod ljudi. Poliamini spermidin i spermin te putrescin su nezamjenjive komponente svih živih stanica, prvenstveno potrebne za pravilno funkcioniranje metabolizma i održavanje imunološkog sustava crijeva, rast i diferencijaciju stanica (Silla Santos 1996.). Imaju različitu elektrostatsku interakciju s makroelementima poput DNA, RNA i proteinima te sudjeluju u njihovoj regulaciji i sintezi. Iako stanice imaju sposobnost vlastite sinteze, ipak je potrebna kontinuirana opskrba poliaminima iz hrane u odgovarajućim količinama. BA kao što su putrescin, kadaverin, spermidin i spermin imaju antioksidativno djelovanje, vežu slobodne radikale i inhibiraju oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina čime sprječavaju nastanak degenerativnih bolesti (Glória 2005.). Međutim, nisu svi biogeni amini bioaktivne molekule. Štoviše, većina njih, ukoliko su prisutni u većim količinama, djeluju kao spojevi kvarenja hrane, antinutritivni čimbenici i katalizatori nepoželjnih reakcija u tijelu koji mogu povećati toksičnost i ostalih prisutnih BA.

2.2. Toksični učinak

Ozbiljnost kliničkih simptoma intoksikacije biogenim aminima ovisi o količini i vrsti BA koji su uneseni hranom i mogućnost njihove prirodne detoksifikacije u ljudskome organizmu (Loizzo i sur. 2013.). Nakon konzumacije hrane, male količine BA se metaboliziraju u ljudskome intestinalnom sustavu do fiziološki manje aktivnih oblika djelovanjem amin-oksidaaza (monoamin- i diamin-oksidaze). Problem se javlja ukoliko je konzumirana prevelika koncentracija BA ili zbog nemogućnosti detoksifikacije od strane pojedinca zbog određenih genskih poremećaja, pušenja, konzumacije alkohola, lijekova (npr. antidepresiva), bolesti (npr. gastritis, Kronova bolest i dr.) ili jednostavno slabijeg imunološkog sustava. U tom slučaju, BA ulaze u krvotok čime dolazi do otpuštanja adrenalina i noradrenalina što uzrokuje povećano lučenje želučane kiseline, visoku razinu šećera u krvi, hipertenziju, tahikardiju, glavobolju i ostalo (Linares i sur. 2011.).

Od svih navedenih, histamin se smatra najčešćim i najozbiljnijim uzročnikom trovanja. Trovanje histaminom se još naziva i „skombrotoksizam“, a samo ime potječe od tegoba koje se javljaju nakon konzumacije plavih riba iz porodice *Scombridae* (tuna, haringa, srdela, skuša.). Obzirom da su zabilježeni i drugi slučajevi trovanja histaminom uzrokovani konzumacijom ostalih namirnica poput primjerice sira (**Tablica 2.2.1.**) ili vina, koristi se i naziv „histaminsko trovanje“. Simptomi dolaze do izražaja već nakon 30 minuta, a uključuju glavobolju, povraćanje, vrtoglavicu, grčeve i bol u trbuhu, dijareju, osip, crvenilo očiju i ostale već navedene simptome koji prolaze unutar 24 sata. Teži slučajevi trovanja histaminom bilježe pojavu iznenadnog abnormalnog suženja dišnih puteva (bronhospazam), gušenje i teški respiratorni distres (Shalaby 1996.). S druge strane, trovanje tiraminom ili „sirna

reakcija“ povezana je s konzumacijom sireva, posebice onih s dugim periodom zrenja poput Goude, Ementaler, Gruyere ili Cheddar sira, a izaziva glavobolju i hipertenziju (Loizzo i sur. 2013.). Osim što je sam po sebi toksičan, tiramin ulazi u reakcije s inhibitorima monoamin-oksida (lijekovi) i uzrokuje hipertenzivnu krizu. Biogeni amini su također istraživani kao potencijalni kancerogeni i mutageni spojevi s obzirom da mogu biti nitrozirani ili djelovati kao prekursori nitrozamina. Zagrijavanjem putrescina i kadaverina dolazi do njihovog prelaska u pirolidin i piperidin od kojih se formiraju toksični i kancerogeni spojevi N-nitrozopirolidin i N-nitrozopiperidin. N-nitrozamini se mogu sintetizirati *in vivo* u ljudskome organizmu preko unesenih amina. Produkt reakcije tiramina i nitrita, 3-diazotiramin, inducira pojavu raka usne šupljine kod štakora. Inkubacijom tog mutagenog spoja pri temperaturi od 37°C i pH vrijednosti 1,0 – 2,0 dolazi do njegovog značajnog povećanja unutar jednog sata. To istraživanje je značajno obzirom da takvi uvjeti sredine predstavljaju uvjete u ljudskom želucu i samim time povećavaju rizik od oboljenja (Shalaby 1996.).

Zbog individualnih razlika pojedinaca teško je odrediti graničnu vrijednost BA. Linares i sur. (2011.) navode kako je granična vrijednost histamina 100 mg/kg namirnice, a za piće (npr. pivo ili vino) iznosi 2 mg/L dok je vrijednost za tiramin između 100 i 800 mg/kg, a za feniletilamin 30 mg/kg namirnice. BA mogu imati međusobno sinergistički učinak, odnosno, kada jedna tvar koja nema značajan utjecaj pojačava učinak druge tvari. Putrescin, kadaverin, spermin, tiramin i triptamin potenciraju toksičnost histamina smanjenjem ili inhibicijom histamin-oksida (Silla Santos 1996.). Općenito, unos više od 100 mg amina po kg namirnice može biti opasan za zdravlje zdravih pojedinaca, 5 – 10 mg histamina može imati utjecaj na osjetljive osobe, a 10 mg histamina u hrani je tolerantna granica za organizam. Međutim, smatra se kako 100 mg/kg izaziva srednju, a 1000 mg/kg izuzetnu toksičnost (Şanlı i Şenel 2015.).

Tablica 2.2.1. Trovanje biogenim aminima hranom u nekim zemljama svijeta
(Izvor: Glória 2005.)

Zemlja	Godine	Broj incidenata	Hrana
Danska	1976 – 1982	33	Riba (tuna, skuša)
	1993 – 1998	13	
Francuska	1980 – 1983	10	Riba (tuna, sardina, haringa), sir (Cheshire, Gruyere, Ementaler), meso (šunka)
Japan	1950 – 1954	14	Riba (konzervirana skuša, sardina, tuna)
	1970 – 1980	42	Riba (tuna, skuša, sadrina, lampuga, crni marlin, inćuni) meso (piletina)
Kanada	1975 – 1981	6	Riba (tuna, skuša, lampuga), sir (Cheddar)

Nizozemska	1967	?*	Sir (Gouda)
Novi Zeland	1973 – 1975	?*	Riba (tuna, skuša, losos, gof)
Njemačka	1971 – 1982	?*	Riba (tuna, skuša, sardina), sir (Gouda), kiseli kupus
Sjedinjene Američke Države	1968 – 1981	110	Riba (tuna, skuša, lampuga, inćuni), sir (Ementaler)
	1973 – 1987	202	Kit perajar
	1988 – 1998	5	Riba (tuna, lampuga)
Ujedinjeno Kraljevstvo	1976 – 1982	136	Riba (tuna, skuša, sardina, inćuni, papalina, srdela, haringa, gefilte)
	1987 – 1996	105	Riba (tuna, skuša, losos)

* - informacija nije dostupna

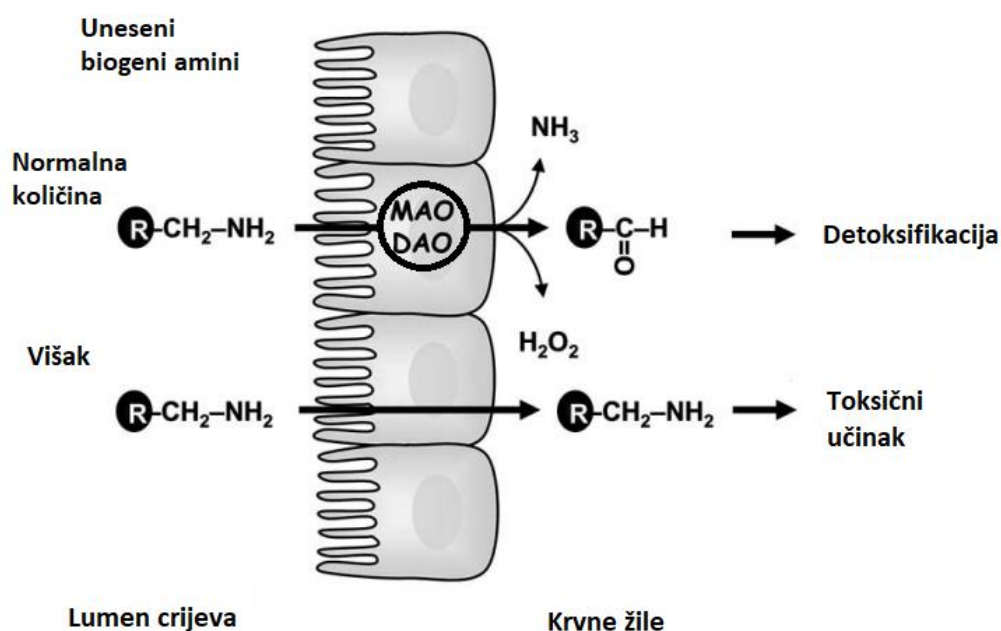
2.3. Mehanizam detoksifikacije

Katabolički put biogenih amina u organizmu je reguliran monoamin-oksidazama (MAO) i diamin-oksidazama (DAO) koje kataliziraju oksidativnu deaminaciju BA, dok su poliamini prvo acetilirani nakon čega su oksidirani od strane poliamin-oksidaza (PAO). Općenito, kao produkti oksidacije nastaju amonijak, vodikov peroksid i određeni aldehid koji dodatno može biti oksidiran u odgovarajuću karboksilnu kiselinu (Glória 2005.). Ta enzimska barijera koja se nalazi u unutrašnjosti epitelnih stanica, u normalnim fiziološkim uvjetima, ima zaštitnu ulogu u resorpciji BA. Međutim, uslijed višeg unosa BA, amin-oksidaze su neučinkovite zbog čega dolazi do akumulacije biogenih amina u organizmu, a posljedično tome i do toksičnog učinka, što prikazuje **Slika 2.3.1.** Najveća aktivnost detoksifikacijskog sustava je zabilježena u lumenu crijeva što znači da je gastrointestinalni trakt najvažniji izvor egzogenih BA (Tofalo i sur. 2016.).

MAO je enzim koji katalizira oksidativnu deaminaciju tiramina, feniletilamina i triptamina, a u ljudskom organizmu se nalaze dva izoenzima. MAO-A se prvenstveno nalazi u želucu, crijevima i posteljici kod žena, povezan je s noradrenalinom i oktopaminom, a manjak ovog izoenzima izaziva depresiju i abnormalno agresivno ponašanje. MAO-B se nalazi u mozgu i selektivnom deaminacijom razgrađuje nepolarne aromatske BA (kao što je feniletilamin), njegova ekspresija se povećava tijekom starenja i može biti povezana s poremećajima kao što su Alzheimerova ili Parkinsonova bolest (Tofalo i sur. 2016.). Tiramin se metabolizira u gastrointestinalnoj sluznici i jetri te oksidativnom deaminacijom prelazi u p-hidroksifenilacetatnu kiselinu što katalizira MAO. Također, tiramin može oksidirati u oktopamin preko dopamin-β-hidroksilaze ili metilacijom u N-metiltiramin uz pomoć N-metiltransferaze (Glória 2005.).

DAO je neselektivan enzim koji oksidira histamin, putrescin i kadaverin, nalazi se u svim perifernim tkivima sisavaca, a ponajviše u gastrointestinalnom traktu gdje je neravnomjerno raspoređen. Glavni enzimi u metabolizmu unesenog histamina su DAO, MAO i N-metiltransferaza, a njihovi konačni produkti se izlučuju putem urina. Nakon 12 sati od konzumacije u urinu su detektirani N-metilimidazol-octena kiselina (42 – 47%), imidazol-octena kiselina konjugirana s ribozom (16 – 23%), imidazol-octena kiselina (9 – 11%), N-metilhistamin (4 – 8%) i neoksidirani histamin (2 – 3%) (Glória 2005.).

Poliamin-oksidaze su specifični enzimi koji razgrađuju poliamine spermin i spermidin uz koenzim flavin-adenin-dinukleotid (FAD). Kao jedan od produkata nastaje Gama-aminomaslačna kiselina koja prelazi u sukcinu kiselinu i ulazi u Krebsov ciklus. Ovaj metabolički slijed može objasniti potpuno recikliranje ugljika i dušika iz poliamina te njegovo iskorištavanje kao izvor organskog dušika za opskrbu stanica u organizmu (Glória 2005.).



Slika 2.3.1. Prikaz ovisnosti količine unosa biogenih amina i učinka u organizmu
(Prilagođeno prema: Ladero i sur. 2010.)

2.4. Biogeni amini u hrani

Biogeni amini su svojstveni svim živim organizmima, stoga su prisutni u biljkama, životinjama i životinjskim proizvodima. Kvantiteta i kvaliteta BA u hrani ovisi o njenoj prirodi i podrijetlu, a može se promijeniti tijekom proizvodnje, prerade, fermentacije i skladištenja. Najčešće i u najvećim količinama se nalaze u hrani bogatoj proteinima kao što su meso, riba, mliječni proizvodi te poneka alkoholna pića. Otporni su na visoke temperature zbog čega je njihovo prisustvo dobar indikator svježine, mikrobne kvalitete, ali i kvarenja svježih i prerađenih prehrambenih proizvoda (Glória 2005.).

Već je prethodno spomenuto kako prisutnost BA u hrani ovisi o dostupnosti prekursora, proteina i/ili slobodnih aminokiselina, te prisutnosti mikroorganizama sa sposobnošću dekarboksilacije. U nefermentiranoj hrani njihova povećana pojavnost je povezana s lošom higijenskom kvalitetom hrane (Tabanelli i sur. 2018.). U voću i povrću su spermin, spermidin i putrescin široko rasprostranjeni, a istraživanja pokazuju kako poliamini imaju važnu ulogu u rastu korijena, razvoju cvijeta i ploda, kontroli intracelularnog pH i odgovoru na abiotički stres poput suše, osmotskog šoka, nedostatka kalija te infekcija patogenim mikroorganizmima. (Silla Santos 1996.). U bananama iz Poljske uočene su više koncentracije kadaverina (36,2 mg/kg) i tiramina (23,5 mg/kg), putrescina (14,63 mg/kg) u maslinama iz Italije te spermidina (22,3 mg/kg) u sirovom kupusu iz Španjolske, što je različito od fermentiranog kupusa, gdje su zabilježene više koncentracije putrescina (108,9 mg/kg), tiramina (60,66 mg/kg) i histamina (37,01 mg/kg). U sokovima od marelice, breskve i kruške iz Italije utvrđena je visoka koncentracija kadaverina (17,22 mg/kg) te putrescina (5,02 mg/kg) u soku od ananasa iz Poljske (Papageorgiou i sur. 2018.). Ustanovljeno je da se razine BA tijekom vremena skladištenja mogu povećati, tako prisutni feniletilamin, putrescin i tiramin u gljivama bilježe povećan rast tijekom skladištenja na temperaturama od 4°C i 25°C, ali termičkom obradom već nakon 5 minuta dolazi do njihove redukcije za oko 80% (Shalaby 1996.). Zrna kakaa sadrže male količine feniletilamina i tiramina, ali njihovim prženjem dolazi do povećanja razine feniletilamina. Suprotno tome, prženjem zrna kave dolazi do smanjenja ukupne količine putrescina, spermina i spermidina (Glória 2005.).

Neosporno je da se najveća pozornost, u pogledu količine i sadržaja BA, predaje ribi i ribljim proizvodima, te su to jedine namirnice za koje je zakonom propisana maksimalna dopuštena količina histamina i iznosi 100 mg/kg (Shalaby 1996.). Pod normalnim uvjetima, mišići ribe sadrže visoke razine spermina i spermidina, a niske razine histamina i putrescina. Ipak, glavnu ulogu u formiranju biogenih amina ima mikroflora ribe, koja varira ovisno o okolišu, hranidbi i higijenskim uvjetima tijekom ulova, rukovanja, prerade i pohrane ribe. Najčešće izolirani i glavni proizvođači BA, točnije histamina, u ribi su bakterije *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* i *Klebsiella pneumoniae*. Visoke koncentracije bakterija su najčešće pronađene u probavnom sustavu, na koži i u škrgama riba putem kojih dolaze do mišića gdje mogu doseći razine od 6×10^8 cfu/g. Ribe iz porodice *Scombridae* poput tune, srdele, inćuna, haringe ili skuše su sklone tvorbi histamina jer su bogate slobodnim histidinom, tako haringa sadrži oko 1 g/kg, a tuna čak 15 g/kg slobodnog histidina. Istraživanja su pokazala kako se razina spermina i spermidina smanjuje, a razina putrescina, histamina i ostalih biogenih amina povećava tijekom skladištenja, ali i kvarenja ribe. Stopa promjene ovisi o temperaturi skladištenja, pH, prisustvu kisika, nutrijenata, aditiva i načinu pakiranja (Glória 2005.). Temperatura pohrane je glavni čimbenik koji utječe na tvorbu histamina i ostalih BA u mesu ribe. Čak i tek svježe ulovljena riba koja ne sadrži gotovo nikakve koncentracije histamina, već nakon 24 sata skladištenja pri sobnoj temperaturi bilježi njegovu tvorbu i povećanje razine, dok s druge strane, niže temperature (<5°C) smanjuju brzinu stvaranja BA (Shalaby 1996.). Papageorgiou i sur. (2018.) prema Bilgin i sur. (2015.) navode kako je utvrđena prisutnost kadaverina u konzerviranoj tuni i sardinama iz Turske u koncentraciji od $122,18 \pm$

68 mg/kg, triptamina u mariniranim incunima od $190,61 \pm 7,67$ mg/kg, histamina od $110,33 \pm 9,87$ mg/kg i putrescina u maksimalnoj koncentraciji od $116,53 \pm 2,90$ mg/kg u konzerviranoj tuni.

Svježe meso je veoma podložno kemijskim, fizikalnim i mikrobiološkim promjenama tijekom pohrane ili tijekom njegove prerade u mesne proizvode. U mesu su prirodno prisutni putrescin, spermin i spermidin, a s obzirom da meso sadrži mikroorganizme koji svojom proteolitičkom aktivnošću stvaraju slobodne aminokiseline, dolazi i do sinteze histamina, putrescina, tiramina, triptamina, feniletilamina i kadaverina (Glória 2005.). Jednako kao i kod ribe, tijekom nepravilnog skladištenja svježeg mesa, koncentracija spermina i spermidina se smanjuje, a ostalih povećava što ponajviše ovisi o temperaturi skladištenja. Svinjetina skladištena na 30°C sadrži veće koncentracije BA u usporedbi sa svinjetinom pohranjenom na 4°C , a na temperaturi od -18°C razina BA u svinjetini se nije promijenila tijekom 9 mjeseci (Shalaby 1996.). Visoke razine BA su nađene u suhim fermentiranim kobasicama; tako je zabilježena prisutnost kadaverina, putrescina i histamina u koncentracijama od 689,89 mg/kg u fermentiranim kobasicama što se razlikuje od BA nađenim u suhomesnatim proizvodima gdje je prevladavajući spermin s rasponom koncentracija od $11,69 \pm 0,77$ do $46,32 \pm 0,39$ mg/kg (Papageorgiou i sur. 2018.). Razina BA u mesnim prerađevinama je izrazito varijabilna (Glória 2005.), a razlog može biti različito trajanje fermentacije i zrenja, različita dekarboksilazna aktivnost prisutnih i dodanih mikroorganizama, proizvodni proces i velike varijacije u vrsti i kvaliteti korištenog mesa (Shalaby 1996.). Istaknuto je kako starter kulture rezultiraju stvaranjem manjih količina BA nego kada je prirodna mikroflora odgovorna za fermentaciju (Silla Santos 1996.).

Aminokiseline su glavni spojevi koji daju prehrambenu vrijednost, aromu i okus proizvodima, kao što su sir, vino, med te ostale fermentirane namirnice nastale nakon mikrobne ili enzimske aktivnosti (Papageorgiou i sur. 2018.). Tijekom proizvodnje fermentiranih proizvoda može se očekivati prisustvo različitih vrsta mikroorganizama od kojih su neki sposobni proizvesti BA. Biogeni amini su često izolirani iz fermentirane sojine hrane tradicionalne u Istočnim zemljama, a nađeni su i u kiselom kupusu i ostalom ukiseljenom povrću. Mnoge vrste BA su otkrivene u fermentiranim pićima, poput vina i pive, a koje određuju njihovu kvalitetu u pogledu higijene, ali i arome i okusa (Silla Santos 1996.). Visoka razina BA uzrokuje neugodan i gorak okus te sveukupno slabiju punoću okusa (Glória 2005.). Tijekom alkoholne fermentacije u većim količinama nastaju histamin, tiramin, putrescin i kadaverin (Silla Santos 1996.), ali ipak u manjoj mjeri nego što je prisutno u kobasicama ili pak siru. Međutim, visoka količina etanola unesena u organizam konzumacijom alkoholnih pića inhibira djelovanje prirodnih enzima za detoksifikaciju jetre od BA čime dolazi do njihove akumulacije i neposrednog toksičnog učinka. Stoga, i male količine biogenih amina mogu imati negativne učinke na ljude koji konzumiraju alkohol (Tabanelli i sur. 2018.).

Visoke količine tiramina i histamina, ali i ostalih BA, se mogu sintetizirati i u mliječnim proizvodima, prvenstveno u veoma zrelim sirevima i sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka. Takvi proizvodi predstavljaju idealno okruženje za akumulaciju biogenih amina,

posebice zbog dostupnosti prekursora nastalih proteolizom kazeina i prisutnosti sekundarne mikroflore koja može prevladati tijekom zrenja (Tabanelli i sur. 2018.). Niže koncentracije uočene su u ostalim mliječnim proizvodima, tako je u jogurtu maksimalna koncentracija od 26,1 mg/kg, u mlaćenici 5 mg/kg, u kiselom vrhnju 15,4 mg/kg te 14,3 mg/kg u kefiru. U mliječnim proizvodima iz SAD-a pronađeni su samo putrescin, histamin i agmatin u koncentracijama do 3,2 mg/L (Papageorgiou i sur. 2018.). Stoga, svaka hrana proizvedena fermentacijom ili izložena mikrobnj kontaminaciji tijekom obrade ili skladištenja može sadržavati BA.

3. Biogeni amini u siru

Prema podacima Eurostata iz 2017. godine, u Europskoj Uniji se proizvelo 10,2 milijuna tona sira koji je činio 37% od ukupne proizvodnje mliječnih proizvoda, a najveći proizvođači su bili Njemačka, Francuska i Italija. Takav opseg proizvodnje mnogo govori o važnosti sprječavanja potencijalnih rizika za zdravlje i dobrobit potrošača. Sir može akumulirati visoke koncentracije biogenih amina te je, nakon ribe, najčešće povezana namirnica s trovanjem histaminom (Valsamaki i sur. 2000.). Predstavlja idealnu sredinu za sintezu BA jer sadrži slobodnu vodu, proteine, enzime, kofaktore i mikroorganizme. Osim toga, za njegovu proizvodnju, tvorbu okusa, mirisa i arome sira, važan je proces proteolize čime se sintetizira velika količina slobodnih aminokiselina. Proteoliza je izrazito složen proces koji nastaje pod djelovanjem prirodno prisutnih proteinaza mlijeka, sirila, starter i nestarterskih kultura te njihovih enzima. Kvantitativna i kvalitativna svojstva BA variraju u različitim vrstama sira pa čak i između različitih šarži istog sira, stoga je i njihov učinak na ljudsko zdravlje različit.

Higijenska kvaliteta sirovog mlijeka je značajna za sintezu BA u siru. Sirevi proizvedeni od mlijeka loše mikrobiološke kakvoće sadrže veću razinu BA od sireva koji su proizvedeni od kvalitetnog mlijeka. Mlijeko općenito sadrži nižu koncentraciju BA (≈ 1 mg/L) nego sir. Poliamini su prirodno prisutni u sirovom kravljem mlijeku, od čega je spermin (34%) u najvećoj koncentraciji, slijede putrescin (17%), spermidin (15%) i agmatin (3%) (Glória 2005.). Zabilježeno je kako prekursorske aminokiseline mogu biti prirodno prisutne u mlijeku u slobodnom stanju ili se hidrolizom mogu osloboditi iz mliječnih proteina (Papageorgiou i sur. 2018.). U siru koncentracija spermina i spermidina je niska, dok udio ostalih BA varira ovisno o mikrobiološkoj kvaliteti sirovog mlijeka, vrsti sira, trajanju zrenja i prisutnosti određenih mikroorganizama. Ipak, u najvećoj su količini prisutni tiramin i histamin, a dokazana je i prisutnost putrescina, kadaverina, triptamina i feniletilamina (Glória 2005.).

Iz **Tablice 3.1.** je vidljivo kako sirevi proizvedeni od sirovog mlijeka općenito sadrže veću koncentraciju BA. Takvi sirevi predstavljaju tehnološki izazov jer se njihova proizvodnja temelji na upotrebi prirodnih starter kultura i autohtonoj mikrobioti mlijeka čija metabolička aktivnost nije u potpunosti razjašnjena. Kao primjer navedeni su polutvrđi sirevi Castelmagno, Cantal i Azeitao koje karakterizira tradicionalan način proizvodnje. Međutim, kod sireva proizvedenih od pasteriziranog mlijeka broj dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama je niži zbog čega je smanjen rizik od sinteze BA, čak i ukoliko dođe do naglog povećanja udjela slobodnih aminokiselina. Kod svježih sireva koncentracija BA je niska zbog toga što takvi sirevi ne zriju. Zrenje je važan čimbenik u formiranju BA, što je duže zrenje to će biti veća koncentracija određenih BA s obzirom da se sa zrenjem povećava koncentracija slobodnih aminokiselina (Glória 2005.). Sireve s plijesnima kao što su Gorgonzola i Roquefort karakterizira intenzivna lipoliza i proteoliza zbog međusobnog zajedničkog učinka bakterija i plijesni tijekom zrenja sira. Sukladno tome, može se očekivati da će takvi sirevi imati veću koncentraciju biogenih amina, kao što je navedeno u tablici.

Tablica 3.1. Sadržaj biogenih amina u različitim vrstama sira
(Izvor: Loizzo i sur. 2013.)

	Biogeni amini (mg/kg)						
Sir	HIS	TIR	PUT	KAD	FEA	SPD	SPE
Bez zrenja (sirovo mlijeko)	110,8	233,33	38,75	96,34	n.o.	/	/
Bez zrenja (pasterizirano)	60,2	22,02	n.o.	n.o.	n.o.	/	/
Azeitao	682,0	445,0	137,0	161,0	/	/	17,2
Bergbaron	34,2	192,3	64,0	54,0	312,2	4,5	16,2
Cabrales blue	957,6	/	/	/	/	/	/
Caclotta (sirovo mlijeko)	8,4	9,0	10,7	24,9	n.o.	2,4	n.o.
Caclotta (pasterizirano)	7,3	5,6	8,3	44,9	3,9	1,4	1,2
Cantal	94,7 – 165,6	323,4 – 486,4	28,0 – 40,8	0 – 2,1	0 – 13,0	6,8 – 10,6	n.o.
Castelmagno	645,8	1009,1	/	310,4	/	0,4	449,6
Ementaler	23,5 – 117,5	52,5 – 64,5	3,9 – 38,0	98,3	n.o.	14,0 – 16,8	28,5
Feta	84,6	24,6	19,3	82,8	4,94	/	/
Gorgonzola	23,7 – 225,3	13,2 – 247,6	3,2 – 31,3	33,7 – 748,2	n.o.	0 – 17,2	0 – 10,8
Gouda	40,0	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	1,7	0,5
Grana Padano	249,0	18,0	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
Parmesan	148,0	103,0	6,1	12,7	8,6	0,3	2,5
Pecorino (sirovo mlijeko)	6,3	162,0	29,3	107,0	63,3	n.o.	n.o.
Pecorino (pasterizirano)	23,9	350,0	70,9	257,0	155,0	n.o.	n.o.
Manchego (sirovo mlijeko)	226,0	305,1	/	/	/	/	/
Manchengo (pasterizirano)	160,4	/	/	/	/	/	/
Mozarella	40,0	/	/	/	/	/	/
Roquefort	9,9 – 376,6	0 – 2000,0	18,3 – 257,2	0 – 2101,4	0 – 39,7	0 – 18,1	0 – 4,6

HIS- histamin, TIR- tiramin, KAD- kadaverin, PUT- putrescin, FEA- feniletilamin, SPD- spermidin, SPE- spermin
n.o.- neodređeno

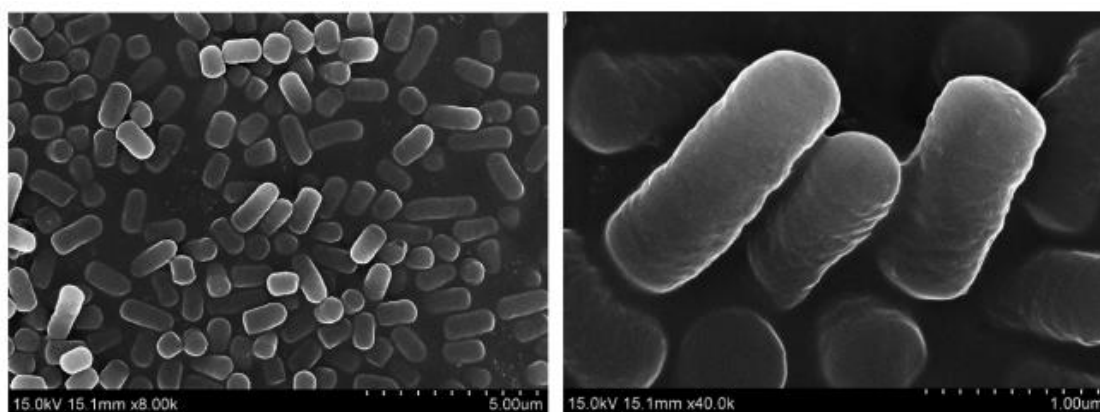
3.1. Mikroorganizmi sa sposobnošću tvorbe biogenih amina

Za sintezu biogenih amina u siru potrebna je prisutnost bakterija koje imaju sposobnost dekarboksilacije aminokiselina i okolišni uvjeti (npr. pH, temperatura i dr.) koji omogućuju optimalan rast mikroorganizama, njihovu tvorbu i aktivnost dekarboksilaza. Mnoge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, kvasci i plijesni mogu sintetizirati BA.

Gram-negativne bakterije poput *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia spp.* te ostale bakterije koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* imaju sposobnost tvorbe histamina, kadaverina i putrescina (Linares i sur. 2011). S obzirom kako se radi o bakterijama uzročnicima kvarenja i patogenim bakterijama koje nisu prirodno prisutne u mlijeku, visok udio BA može biti povezan s lošom kvalitetom i higijenom sirovine, proizvodnje i prerade mlijeka. Ipak, ne postoji direktna povezanost između ukupnog broja bakterija i stvorenih BA, što znači da je ta sposobnost između bakterija izrazito varira i da je soj specifična (Valsamaki i sur. 2000.). Zatim, kvasci poput *Yarrowia lipolytica* i *Debaryomyces hansei* te plijesni *Geotrichum candidum* tvore histamin, tiramin, kadaverin i putrescin. Ipak, glavni proizvođači BA u siru su Gram-pozitivne bakterije, od kojih su bakterije mliječne kiseline (BMK) zaslužne za tvorbu tiramina, putrescina i histamina. U njih ubrajamo *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Streptococcus* vrste koje mogu biti prirodno prisutne u mlijeku, naknadno kontaminirati mlijeko/sir ili biti dodane tijekom proizvodnje u obliku starter kulture. **Slika 3.1.1.** prikazuje morfološki izgled bakterije *Lactobacillus brevis*, jedne od najznačajnijih bakterija sa mogućnošću tvorbe tiramina (**Tablica 3.2.1.**). Shalaby (1996.) je izvijestio kako je prisustvo histamina u siru rezultat dekarboksilazne aktivnosti bakterija starter kulture kao što su *Lactobacillus helveticus* i *Streptococcus lactis*. Stoga je važno da kultura koja se koristi u proizvodnji sira ne sadrži bakterijske sojeve koje imaju sposobnost enzimske dekarboksilacije aminokiselina i tvorbe BA (Linares i sur. 2011.). Međutim, iako je izbor starter kulture temeljen na odsutnosti tih svojstava, prisutnost dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama u sirovom mlijeku ili među mikrobiotom zrenja često je neizbježna (Tabanelli i sur. 2014.). Enterokoki su u većini slučajeva dominantna mikrobna populacija tijekom zrenja sira zbog širokog temperaturnog raspona rasta i visoke tolerancije na sol. Najčešće izolirane bakterije ove vrste iz sira su *Enterococcus faecalis* (**Slika 3.1.2.**), *Enterococcus faecium* i *Enterococcus durans* te se smatra kako stvaraju najveće količine tiramina te u nešto manjim koncentracijama putrescin, kadaverin i histamin. S druge strane, heterofermentativni laktobacili su najčešći uzročnici tvorbe histamina i putrescina što dokazuje istraživanje koje su proveli Burdychova i Komprda (2007.) na polutvrdom nizozemskom siru. Novella-Rodriguez i sur. (2002.) su ustanovili kako je koncentracija BA veća u siru koji ne sadrži starter kulturu sastavljenu od bakterija *Lactococcus lactis subsp. lactis* i *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, u usporedbi sa sirom koji sadrži navedene bakterije. Iz tih rezultata je ipak vidljivo kako je visoka razina BA najčešće povezana s prisustvom nestarterske kulture BMK koje posjeduju dekarboksilazne enzime. Pintado i sur. (2008.) su izvijestili kako postoji značajna povezanost između ukupnog broja enterokoka i koncentracije feniletilamina, između laktokoka te kadaverina i tiramina, enterobakterija i

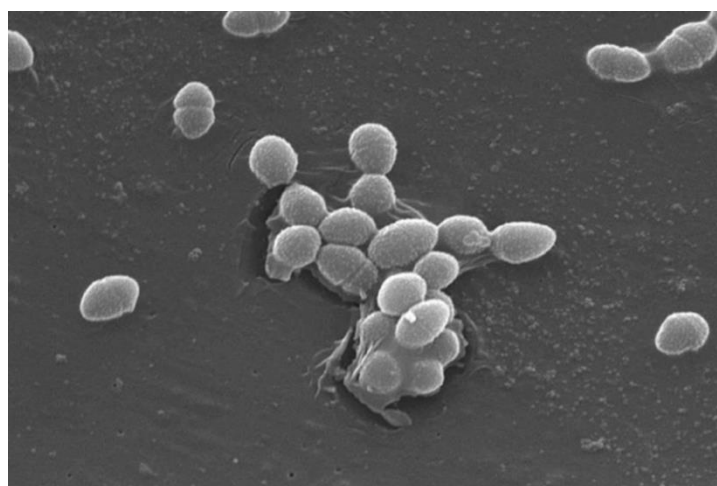
triptamina. Enterokoki i laktokoki na kraju perioda zrenja Terrincho sira dosežu razinu od 10^7 cfu/g, uz istovremeno visok broj enterobakterija. To istraživanje potvrđuje da je i minimalna koncentracija dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama u sirovom mlijeku dovoljna za sintezu značajne koncentracije biogenih amina u konačnom proizvodu. Međutim, prisustvo biogenih amina tijekom fermentacije se može kontrolirati upotrebom starter kultura koje imaju manju sposobnost dekarboksilacije slobodnih aminokiselina (Şanlı i Şenel 2015.).

Mikroorganizmima je za svoj rast i razmnožavanje potreban dovoljan izvor slobodnih aminokiselina, a ukoliko ih nema, procesom proteolize razgrađuju proteine na manje peptide ili aminokiseline koristeći vlastite enzime. Zrenjem dolazi do razgradnje kazeina, glavnog proteina mlijeka, čime se oslobađaju aminokiseline koje služe kao supstrat u sintezi BA. Kako zrenje odmiče kraju tako dolazi do povećanja koncentracije slobodnih aminokiselina, također, mijenja se i dominantna mikrobna populacija što može uzrokovati različitu koncentraciju BA u različitim dijelovima sira (Bunkova i sur. 2010.).



Slika 3.1.1. Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus brevis* dobiven elektronskim mikroskopom

(Izvor: Deng i sur. 2015.)



Slika 3.1.2. Mikroskopski prikaz bakterije *Enterococcus faecalis*

(Izvor: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/318337.php>)

Tablica 3.2.1. Mikroorganizmi s dekarboksilaznom aktivnošću pronađeni u siru
(Izvor: Şanlı i Şenel 2015.)

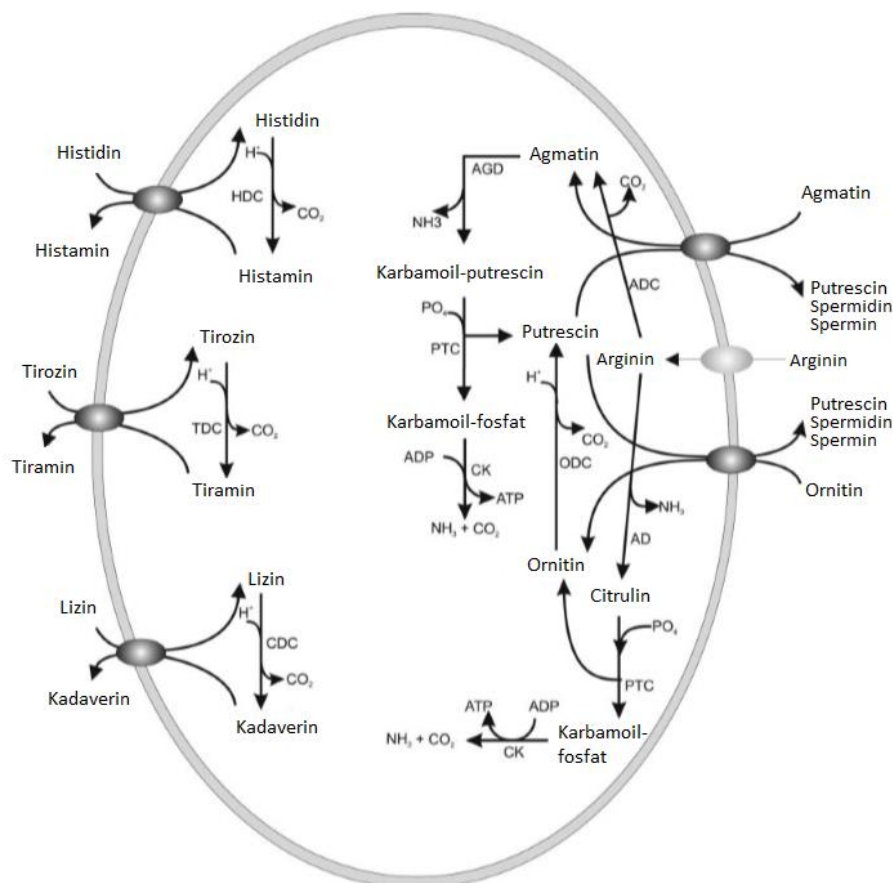
Biogen amin	Enzim		Mikroorganizam
HISTAMIN	Histidin dekarboksilaza	G(-)	<i>Hafnia alvei</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Serratia</i> spp., <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.
		G(+)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>
		Kvasci i plijesni	<i>Debaryomyces hansei</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
TIRAMIN	Tirozin dekarboksilaza	G(-)	<i>Cedecea</i> spp., <i>Hafnia alvei</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter braakii</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
		G(+)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus damnosus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>
		Kvasci	<i>Yarrowia lipolytica</i>
KADAVERIN	Lizin dekarboksilaza	G(-)	<i>Citrobacter braakii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella axytoca</i>
		G(+)	<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>
		Kvasci i plijesni	<i>Yarrowia lipolytica</i>
PUTRESCIN	Ornitin dekarboksilaza	G(-)	<i>Citrobacter braakii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
		G(+)	<i>Lactobacillus curvatus</i>
		Kvasci	<i>Debaryomyces hansei</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
FENILETILAMIN	Fenilalanin dekarboksilaza	G(+)	<i>Enterococcus</i> spp, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Micrococcus</i> spp.
TRIPTAMIN	Triptofan dekarboksilaza	(G+)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>

3.2. Mehanizam nastajanja biogenih amina

Zrenje sira je kompleks fizikalno-kemijskih, biokemijskih i bioloških reakcija koje su međusobno usko povezane, a kojima sir poprima željene karakteristike okusa, mirisa, arome i teksture. Podrazumijeva razgradnju složenih organskih spojeva (mliječna mast, laktoza, kazein) na jednostavnije spojeve (slobodne masne kiseline, mliječna kiselina, slobodne aminokiseline i dr.). Dolazi do promjena u proteinskom matriksu što uzrokuje promjenu teksture i snižavanje pH vrijednosti. Međutim, dugo zrenje i pohrana sira predstavljaju idealnu sredinu za akumulaciju BA s obzirom da stupanj proteolize ovisi o vremenskom trajanju zrenja. Za sintezu BA je važna proteoliza koja započinje pod utjecajem dodanog sirila i starterske kulture BMK, odnosno, njihovih proteolitičkih enzima koji razgrađuju kazein, dok enzimi nestarterske kulture BMK uzrokuju degradaciju peptida na slobodne aminokiseline.

Biogeni amini nastaju dekarboksilacijom odgovarajućih aminokiselina putem supstratspecifičnih enzima koje proizvode prisutni mikroorganizmi. Tako je za sintezu histamina potrebna histidin-dekarboksilaza, za tiramin tirozin-dekarboksilaza, za putrescin ornitin-dekarboksilaza itd. (**Slika 3.2.1.**) Neki enzimi imaju dvostruki učinak, poput enzima tirozin-dekarboksilaze koji, osim razgradnje tirozina u tiramin, može razgraditi i fenilalanin u feniletilamin ili arginin-dekarboksilaza kojim nastaje agmatin, a može nastati i putrescin s obzirom da u mliječnim proizvodima nema ornitina iz kojeg se inače može sintetizirati. Dekarboksilaze se nalaze u unutrašnjosti bakterijske stanice, stoga kako bi aminokiseline dospjele do citoplazme, a samim time i bile razgrađene od strane enzima, potreban im je određeni transportni sustav. On se sastoji od specifičnih proteina koji se nalaze u unutrašnjosti bakterijske membrane koji su zaslužni za prenošenje supstrata (aminokiselina) u citoplazmu stanice i izbacivanje nastalog produkta (biogenog amina) izvan bakterijske stanice. Prema tome, za sintezu histamina je potreban histidin/histamin transportni sustav, za tiramin tirozin/tiramin sustav itd. (Linares i sur. 2011.). Specifični enzimi uklanjaju α -karboksilnu skupinu, izdvaja se CO_2 i nastaje odgovorajući amin (Shalaby 1996.).

Nije točno poznato zbog čega mikroorganizmi tvore BA već se pretpostavlja kako je to dio obrambenog mehanizma u nepovoljnoj sredini. Dekarboksilacijom se povećava preživljavanje pri niskim pH vrijednostima tako što mikroorganizmi unose protone u stanicu i izbacuju amine i CO_2 čime uspostavljaju optimalan pH medija. Također, tvorba može biti i odgovor na osmotski ili oksidativni stres, pa čak i kao jedan od načina dobivanja ATP energije (Linares i sur. 2011.).



Slika 3.2.1. Slikovni prikaz dekarboksilacije aminokiselina u bakterijskoj stanici i sinteza biogenih amina.
(Prilagođeno prema: Linares i sur. 2011.)

3.3. Čimbenici koji utječu na akumulaciju biogenih amina

Jedan od čimbenika koji utječe na tvorbu BA u siru je pH vrijednost sredine. Bakterijske dekarboksilaze pokazuju najveću aktivnost pri pH između 4,0 i 5,5 (Loizzo i sur. 2013.). Kada se uzme u obzir da pH vrijednost sireva iznosi od 4,5 za polutvrde ili primjerice 5,1 – 5,4 za tvrde i ekstra tvrde sireve na kraju perioda zrenja, može se reći kako je rizik od sinteze BA u ovom slučaju velik. Iako pojedini autori navode kako se aktivnost dekarboksilaza smanjuje naglim padom pH vrijednosti, što je povezano sa sposobnošću rasta mikroorganizama pri takvim uvjetima, ipak se većina autora slaže kako postoji povezanost između povećanja kiselosti i sinteze biogenih amina (Linares i sur. 2011.). S genetske točke gledišta, transkripcija mnogih genskih dekarboksilaznih klastera je inducirana niskim pH i pogoduje reakciji stanica na kiseli distress (Tabanelli i sur. 2018.). To potvrđuje istraživanje provedeno na tradicionalnom turskom mekom ovčjem siru od strane Andic i sur. (2010a.) gdje je veći broj BA pronađen u uzorcima s nižom pH vrijednosti. Postoji pozitivna korelacija između ukupne koncentracije organskih kiselina i BA, konkretno, između octene kiseline i stvorenog

histamina, tiramina, kadaverina, putrescina i feniletilamina. Također, pri pH 5,0 dolazi do strukturalnih promjena histidin-dekarboksilaza koje su potrebne za njihovu aktivnost te je zabilježena veća aktivnost bakterije *Enterococcus durans* za sintezu tiramina u usporedbi s njezinom aktivnošću u pH neutralnoj sredini (Linares i sur. 2011.). Ipak, utjecaj pH vrijednosti je različit ukoliko se razmatra dekarboksilazna aktivnost živih stanica ili samostalnih dekarboksilaznih enzima oslobođenih lizom bakterijske stanice. Tirozin-dekarboksilaze pokazuju maksimalnu aktivnost pri pH između 5 i 6, dok je maksimalna akumulacija tiramina kod živih stanica BMK uočena pri nižem pH, od 4 do 5. Optimalni pH za aktivnost histidin-dekarboksilaze Gram-negativnih bakterija je skoro pa neutralan, između 6 i 7, a isti enzim kod bakterije *Streptococcus thermophilus* ima optimum na pH 4,5 (Tabanelli i sur. 2018.).

Temperatura se smatra kao jedan od parametara koji ima najveći utjecaj na tvorbu BA u siru. Poznato je kako svaka mikrobna vrsta ima svoju optimalnu temperaturu rasta te može rasti i u više-manje širem temperaturnom rasponu. Međutim, bolji uvjeti za rast mikrobnih stanica ne moraju se nužno podudarati s optimalnim uvjetima za proizvodnju BA. Općenito, dekarboksilaze su najaktivnije na temperaturama između 20 i 37°C, a neaktivne na >40°C, ali pokazuju aktivnost i na temperaturama između 0 i 10°C (Glória 2005.). Inkubacijom bakterije *Enterococcus faecalis* tijekom 24 sata utvrđena je maksimalna aktivnost dekarboksilaza na temperaturi od 37°C, međutim, najveća tvorba tiramina se odvija pri 20°C. To se može objasniti činjenicom kako je dekarboksilacija tirozina najintenzivnija pri težim okolišnim uvjetima za bakterijsku stanicu, što zahtjeva veći utrošak energije za suprotstavljanje stresnim uvjetima, a poznato je kako putem dekarboksilacije bakterija crpi potrebnu energiju (Tabanelli i sur. 2018.). Bunkova i sur. (2010.) su utvrdili kako veće temperature zrenja uzrokuju porast sinteze BA u nizozemskom tipu sira. Naime, najveće koncentracije tiramina, putrescina i kadaverina su nađene u uzorcima pohranjenim na 10°C kroz čitav period zrenja, a najmanje koncentracije kod uzoraka koji su nakon 28 dana zrenja na 10°C pohranjeni na 5°C do kraja perioda zrenja u ukupnom trajanju od 98 dana. Što znači da niti temperature od 5°C ne mogu u potpunosti inhibirati sintezu BA. Ipak, većina sireva zrije na temperaturama između 5 i 16°C, a svakim povećanjem stupnja, povećava se i tvorba BA. Peptidaze i proteinaze mikroorganizama dodane kulture u proizvodnji sira su veoma aktivne na početku zrenja na temperaturama oko 16°C čime proizvode kratke peptide i slobodne aminokiseline te je veća aktivnost bakterijskih dekarboksilaza (Pachlova i sur. 2012.). Međutim, stopa proteolize se smanjuje već nakon 15. dana zrenja što su Valsamaki i sur. (2000.) ustvrdili tijekom praćenja zrenja Feta sira. Razina BA se od 3. do 15. dana naglo povećava te do 60. dana bilježi samo blagi porast, a od 60. do 120. dana se razina BA gotovo udvostručuje. Iako se povećanjem temperature smanjuje trajanje zrenja gotovo za polovicu vremena, uvijek postoji rizik od sinteze biogenih amina koji se mogu akumulirati u takvim koncentracijama koje mogu biti opasne po zdravlje. Temperaturom i vremenom zrenja se može utjecati na biokemijske reakcije, mikrobiološki rast i sintezu određenih metabolita koji dovode do akumulacije biogenih amina. Uspoređivan je bio učinak temperature i vremena na sintezu BA u iranskom siru iz salamure, te je dobiveno kako kraćim vremenom zrenja, a višom temperaturom dolazi do veće sinteze BA, dok duljim vremenom zrenja i istom temperaturom

se ona smanjuje. Takav kontradiktorni učinak može biti objašnjen fizikalnim i reološkim promjenama koje se događaju tijekom zrenja takvog sira. U početku zrenja sirno tijesto je čvrsto te omogućuje da se BA akumuliraju u unutrašnjosti sira, a nakon nekog vremena dolazi do omekšavanja teksture sira te amini mogu difundirati iz sirnog tijesta u salamuru što se dodatno pospješuje povećanjem temperature (Loizzo i sur. 2013.). U svakom slučaju, sposobnost sinteze BA je ograničena smanjenjem temperature, stoga kontrola hladnog lanca tijekom skladištenja i prodaje hrane ostaje jedan od glavnih alata kojima se može izbjeći i spriječiti akumulacija.

U posljednje vrijeme poduzimaju se nove tehnološke mjere kako bi se ubrzalo dozrijevanje sira povećanjem razine proteolize na način da se dodaju proteolitički enzimi ili proteolitičke starter kulture, često u kombinaciji s peptidazama kako bi se osigurala razgradnja gorkih peptida. Sve to uzrokuje povećanje koncentracije peptida i slobodnih aminokiselina koje služe kao prekursori u sintezi biogenih amina od strane dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama. Innocente i D'agostin (2002.) su istraživali povezanost između stupnja proteolize i količine BA u polutvrdom talijanskom siru između 30. i 150. dana zrenja, a rezultati su pokazali pozitivnu korelaciju. Koncentracija tiramina i histamina se povećava tijekom zrenja, a 150. dan ona iznosi 39 do 40 mg/100 g sira, koncentracija kadaverina iznosi od 2,58 do 16,75, a putrescina od 54,98 do 110,46 mg/100 g sira dok su triptamin i feniletilamin prisutni u veoma niskim koncentracijama kroz cijelo razdoblje. Rezultati ovog istraživanja pokazuju mogućnost korištenja analize biogenih amina kao pokazatelja stupnja proteolize u siru s obzirom da je dokazana veza između ukupnog sadržaja BA i koeficijenta proteolitičkog sazrijevanja. Međutim, dodatak proteolitičkih enzima u pasterizirano mlijeko tijekom proizvodnje Goude nije sam po sebi uzrokovao povećanje razine BA, već je do povećanja došlo kada su u mlijeko bili inokulirani bakterijski sojevi *Lactobacillus* spp.. Iz toga se može zaključiti kako je ipak prisutnost dekarboksilirajućih mikroorganizama presudna u formiranju BA.

Podaci pokazuju povećanje proteolitičkih indeksa tijekom zrenja sira te dužim trajanjem zrenja dolazi do intenzivnije proteolize zbog veće količine slobodnih aminokiselina i produžene aktivnosti dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama. Ukupna količina BA u Feta siru povećava se s 21 mg/kg 3. dan, na 273 mg/kg 15. dan, te na 330, 501 i 617 mg/kg nakon 2., 3. i 4. mjeseca zrenja. Povećanje ukupne koncentracije BA sa zrelošću sira ovisi o postupcima proizvodnje i zrenja te nije linearno za svaku vrstu sira (Nunez i Medina 2016.). Njega tijekom zrenja sireva s mazom, koja uključuje čišćenje površine kore sira, rezultira sa smanjenjem razine BA u odnosu na sir gdje čišćenje nije bilo provedeno. Takva vrsta sira bilježi veći sadržaj tiramina i putrescina u razinama koje premašuju 100 mg/kg (Mayer i Fiechter 2018.).

U pojedinim sirevima prisutan je i različit raspored određenih biogenih amina u unutrašnjosti sira. Tako su, primjerice, Komprda i sur. (2007.) zabilježili izraženiju akumulaciju BA, posebice tiramina, bliže kori sira nego u sredini sira tijekom 6 mjeseci zrenja nizozemskog tvrdog sira. Isti autori navode rezultate istraživanja Petridis i Steinharta iz 1996. godine koji su također izvijestili povećanje sadržaja histamina i tiramina od sredine prema

kori švicarskog tipa sira, a svoje su rezultate objasnili činjenicom kako su u vanjskom djelu sira bolji uvjeti rasta za aerobne i aerotolerantne anaerobne mikroorganizme.

Značajan utjecaj na razinu proteolize ima i prešanje sira. Primjena visokog tlaka na sir uzrokuje lizu bakterijskih stanica i oslobađanje dekarboksilaza i intracelularnih proteinaza koje razgradnjom proteina i peptida osiguravaju uvjete za sintezu i akumulaciju BA. Općenito, utjecaj visokotlačnih tretmana na akumulaciju BA u siru ovisi o vrsti, stupnju zrelosti sira kada je tretman primijenjen i razini tlaka. Tako je uočena razlika između kozjih sireva koji su prešani na 400 MPa tijekom 5 minuta, 50 MPa tijekom 72 sata te kombinacija oba postupka na temperaturama od 14°C kroz 28 dana zrenja. Zabilježen je veći sadržaj tiramina i histamina u siru koji je tretiran s 50 MPa u odnosu na neobrađeni kontrolni sir, dok je njihova razina u drugim sirevima niža. Putrescin, kadaverin, spermin i spermidin su se višestruko povećali u siru gdje je korišten tlak od 50 MPa te kombinacija tlaka od 400 MPa tijekom 5 minuta i 50 MPa 72 sata. U sirevima s plavom plemenitom plijesni učinak tretmana s visokim tlakom na koncentraciju BA je zanemariv. Na 90. dan ukupna količina BA u kontrolnom siru iznosi 8,2 mg/kg, 6,2 – 11,0 mg/kg u sirevima koji su tretirani na 400 MPa te 7,1 – 9,5 gdje je primijenjen tlak od 600 MPa, ali nakon 360 dana kontrolni sirevi sadrže 233 mg/kg biogenih amina, 201 – 294 mg/kg sirevi obrađeni tlakom od 400 MPa te 252 – 353 mg/kg u sirevima koji su tretirani na 600 MPa. Međutim, koncentracija tiramina je nakon završetka zrenja smanjena za oko 50% kod sireva s plemenitom plijesni gdje je primijenjen niži tlak, a za oko 40% kod tlaka od 600 MPa (Nunez i Medina 2016.). Poneki autori pak navode kako primjenom višeg tlaka dolazi do smanjenja razine BA u siru što je povezano sa smanjenjem mikrobne populacije i inaktivacije enzima, zbog čega se smatra da je primjena ove metode na akumulaciju BA u siru izrazito varijabilna, kao što je navedeno u **Tablici 3.4.1.** Calzada i sur. (2013.) su izvijestili kako ukupna koncentracija BA u siru od sirovog ovčjeg mlijeka koji nije prešan na 60. dan doseže razinu od 558 mg/kg te 1993 mg/kg na 240. dan, sirevi prešani s tlakom od 400 MPa sadrže 27 – 33% i 11 – 45% nižu razinu BA na 60. i 240. dan, dok sirevi tretirani tlakom od 600 MPa postižu 40 – 65% niže razine 60. dan te 73 – 76% niže razine 240. dan. Calzada i sur. (2012.) su pratili učinak tlaka na proteolizu i akumulaciju BA u siru s plavom plemenitom plijesni *Penicillium roqueforti* tijekom 90 dana zrenja i 270 dana hladne pohrane. Na sir je primijenjen tlak od 400 MPa ili 600 MPa nakon 3, 6 ili 9 tjedna zrenja, a nakon 90 dana aminopeptidazna aktivnost, proteoliza i količina slobodnih aminokiselina je niža u prešanom siru, posebice na 600 MPa, nego kod sira na kojeg tlak nije primijenjen. Općenito je koncentracija tiramina u sirevima niža, ali triptamin, feniletilamin, i putrescin u nekim uzorcima prešanog sira pokazuju veću vrijednost, posebice kod sira prešanog na 600 MPa nakon 9 tjedana zrenja.

Dodatno, čimbenici poput gustoće naseljenosti mikroorganizama u mediju, međusobni sinergistički učinak te prisutnost kofaktora i vitamina također utječu na akumulaciju BA u siru (Valsamaki i sur. 2000.). Dodatak veće količine inokuluma tijekom proizvodnje sira Goude rezultirao je većom koncentracijom stvorenih BA tijekom 3 mjeseca zrenja. Konkretno, bakterija *Lactobacillus buchneri* St2A dodana je u različitim koncentracijama od 0,01, 0,2 i 5 cfu/ml što uzrokuje povećanje populacije bakterija sa sposobnošću sinteze BA u

koncentracijama od 3×10^5 , 6×10^6 i 1×10^8 cfu/g sira. U siru su prisutne veće koncentracije histamina od 35, 410 i 1060 mg/kg koje su povezane s količinom inokuluma, ali ne i izravno proporcionalne. Razina starter kulture koja se koristi u proizvodnji Manchego sira utječe na koncentraciju BA nakon 3 mjeseca zrenja s 24% više tiramina i 20% više histamina u siru koji sadrži 1,0% koncentracije startera u odnosu na sir s 0,1%. Međutim, rezultati autora su višeznačni te povećanje koncentracije BA u siru dodatno pripisuju nešto višoj pH vrijednosti što pogoduje stvaranju slobodnih aminokiselina i većoj aktivnosti dekarboksilaza (Nunez i Medina 2016.). Zatim, prisutnost kofaktora piridoksal-fosfata je važna za dekarboksilaciju tirozina, lizina i ornitina u tiramin, kadaverin i putrescin. U mlijeku i siru se nalazi u količini od 42 do 215 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ koja je dovoljna za nesmetanu aktivnost dekarboksilaza (Glória 2005.). Biogeni amini mogu doseći opasne razine ukoliko im je samo jedan od navedenih faktora naklonjen zbog čega je važno pratiti sve aspekte proizvodnje sira te primijeniti određene kontrolne mjere kako ne bi došlo do njihove akumulacije.

3.4. Mjere za kontrolu

Dosadašnja saznanja o biogenim aminima, mikroorganizmima koji ih tvore i uvjetima potrebnim za njihovu proizvodnju nam pomažu u sprječavanju njihove akumulacije i kontroli sinteze u siru. Jednom stvoreni BA teško se mogu uništiti ili ukloniti, stoga se važno pridržavati dobre higijenske i proizvođačke prakse prilikom proizvodnje sira. Budući da prisutnost BA ovisi o prisutnosti dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama, a s obzirom da oni mogu biti dio prirodne mikroflore mlijeka, mnogi su autori proučavali odnos između tretmana mlijeka i sadržaja BA u siru (Linares i sur. 2011.).

Pasterizacija je najučestaliji tretman mlijeka koji se provodi tijekom proizvodnje sira kako bi se smanjio broj patogenih mikroorganizama i mikroorganizama uzročnika kvarenja te sveo na prihvatljivu razinu. Bakterijske vrste porodice *Enterobacteriaceae* i *Enterococcus* vrste, koje imaju sposobnost dekarboksilacije aminokiselina, nisu termorezistentne i ne preživljavaju toplinski tretman obrade mlijeka. To je glavni razlog zbog čega je pronađena niža koncentracija BA u sirevima proizvedenim od pasteriziranog nego što je kod sireva dobivenih od sirovog mlijeka (Loizzo i sur. 2013.). Koncentracija tiramina je u siru proizvedenom od sirovog mlijeka veća u odnosu na sir od pasteriziranog mlijeka, još kada se uzme u obzir da su enterokoki glavni proizvođači tiramina, jasno je zašto je pasterizacija mlijeka važan postupak u kontroli sinteze BA (Linares i sur. 2011.). To dokazuju razna istraživanja. Ordoñez i sur. (1977.) su uspoređivali sir od sirovog i pasteriziranog ovčjeg mlijeka te nakon 6 mjeseci zrenja sir od sirovog mlijeka sadrži 3,5 puta više koncentracije tiramina. Novella-Rodríguez i sur. (2004.) su pokazali da je nakon 90 dana zrenja koncentracija tiramina, histamina, feniletilamina, triptamina, kadaverina i putrescina veća u siru proizvedenom od sirovog kozjeg mlijeka nego u istom siru proizvedenom od pasteriziranog mlijeka. Torracca i sur. (2016.) su pratili zrenje Pecorino sira proizvedenog od sirovog i pasteriziranog mlijeka u tvorničkim uvjetima zrenja i sa zrenjem u pećini. Nakon 4 mjeseca zrenja, sir od sirovog mlijeka sa zrenjem u pećini sadrži ukupno najveću količinu BA

(prosječno 1596 mg/kg) od čega je koncentracija tiramina najveća (prosječno 871 mg/kg), a statistička analiza pokazuje kako međusobna interakcija pasterizacije i uvjeta zrenja ima značajan utjecaj na sintezu pojedinačnih, ali i ukupne koncentracije BA. Međutim, toplinskim tretmanom se mogu samo reducirati, ali ne i u potpunosti ukloniti uzročnici tvorbe BA. Mnoge vrste koje su sposobne sintetizirati BA su pronađene i u pasteriziranom mlijeku zahvaljujući svojoj otpornosti na visoke temperature obrade mlijeka. Smanjen broj mikroorganizama u pasteriziranom mlijeku dovodi i do manjeg stupnja proteolize tijekom zrenja sira, čime se oslobađa manja količina slobodnih aminokiselina, posljedično čemu je i manja sinteza BA. Također, visoke temperature inaktiviraju koenzim piridoksal-fosfat koji je važan za dekarboksilatnu aktivnost mikroorganizama (Linares i sur. 2011.).

Netermička obrada sirovog mlijeka, a koja može znatno utjecati na kontrolu BA u siru, uključuje baktofugaciju, primjenu visokog hidrostatskog tlaka i homogenizaciju pa čak i način pakiranja sireva. Baktofugacijom se smanjuje ukupan broj bakterija i njihovih spora iz mlijeka čime je manji rizik od sinteze BA u siru. Takav tretman je korišten u proizvodnji švicarskog sira gdje je količina putrescina 24 puta, a kadaverina 7 puta manja u odnosu na sir u čijoj proizvodnji je korišteno neobrađeno, sirovo mlijeko. Međutim, baktofugacija nije imala učinak na tvorbu histamina i tiramina (Nunez i Medina 2016.). Primjena visokog hidrostatskog tlaka na sirovo mlijeko raspona od 100 – 1000 MPa može poslužiti u kontroli sinteze BA u siru, međutim, tlak može izazvati veću proteolizu, a samim time i veću dostupnost aminokiselina. Usporedno s pasterizacijom, ova metoda obrade mlijeka ima manji učinak na smanjenje formiranja BA u siru, što dokazuje istraživanje Novella-Rodríguez i sur. (2002.) na kozjem siru gdje je primijenjen tlak od 500 MPa (15 min/20°C). Nakon 30 dana sir bilježi 48%, a nakon 45 dana 16% veću tvorbu BA nego sir u čijoj proizvodnji je primijenjena pasterizacija, što se pripisuje većoj ukupnoj količini slobodnih aminokiselina u siru. Visokotlačnom homogenizacijom mlijeka (100 MPa) smanjuje se broj kvasaca, laktobacila i mikrokoka, ali ne i enterokoka u Caciotta siru, u odnosu na sir proizveden od sirovog ili termiziranog mlijeka, što rezultira nižim razinama putrescina, kadaverina, histamina, ali ne i tiramina. Također, primjenom iste, u Pecorino siru zabilježen je veći broj kvasaca, a niži broj enterokoka te niže koncentracije putrescina, kadaverina i tiramina nego u siru od sirovog ili termiziranog mlijeka (Nunez i Medina 2016.). Vakuum pakiranje ili pakiranje u modificiranoj atmosferi mogu inhibirati sintezu BA smanjenjem dekarboksilatne aktivnosti mikroorganizama ili njihovih enzima (Loizzo i sur. 2013.). Inhibitorni učinak se prepisuje odsutnosti kisika unutar ambalaže, ili pak prisutnosti CO₂ koji može djelovati kao bakteriostatsko sredstvo mnogim dekarboksilaza-pozitivnim bakterijama tijekom pohrane sira (Tabanelli i sur. 2018.). Andic i sur. (2010b.) su proveli istraživanje na polutvrdom turskom siru od čega je jedan uzorak pakiran pod vakuumom, a drugi nije, te su usporedno promatrali koncentraciju BA u ta dva uzorka tijekom 180 dana zrenja. Sir koji nije bio pakiran pod vakuumom sadrži veće koncentracije putrescina, kadaverina, tiramina i histamina nego sir koji je bio. Međutim, učinak inhibicije tijekom pakiranja ponajviše ovisi o mikroflori sira te okolišnim uvjetima, od čega je temperatura primarna.

Dodatak soli u proizvodnji sireva može imati inhibitorni učinak na sintezu BA s obzirom da utječe na mikrobiološki rast, aktivnost, enzimsku aktivnost i smanjenje udjela slobodne vode. Dobar primjer za to je proizvodnja Feta sira koja uključuje dodatak visoke koncentracije soli. U istraživanju sinteze BA tijekom zrenja Feta sira koje su proveli Valsamaki i sur. (2000.), vidljivo je kako su niska pH vrijednost, koncentracija NaCl (5,25% soli u vodenoj fazi sira) i temperatura (5°C) tijekom zrenja i pohrane u salamuri stvorili nepovoljne uvjete za rast mikroorganizama i tako inhibirali proizvodnju BA. Ukupna sinteza BA nakon 120 dana zrenja iznosi 617 kg/mg sira, gdje su dominantni bili tiramin i putrescin. Andic i sur. (2010a.) su ustvrdili, analizirajući 30 uzoraka mekog ovčjeg sira, da je koncentracija BA niska u onim uzorcima sira koji sadrže više koncentracije soli (4,73-13,80% NaCl-a u vodenoj fazi sira). Dakle, sol doprinosi kontroli dekarboksilazne aktivnosti, međutim, koncentracija soli potrebna za inhibiciju sinteze BA ponekad je previsoka za njihovu primjenu u siru. To vrijedi za bakterije mliječne kiseline, posebice enterokoki vrste koje proizvode tiramin, a koje zadržavaju svoju aktivnost i aktivnost dekarboksilaza na koncentracijama soli većim i od 20% (Tabanelli i sur. 2018.).

Sinteza BA u siru se može kontrolirati korištenjem starter kultura koje nemaju mogućnost tvorbe BA ili koje mogu oksidirati prisutne BA u proizvodu, te inhibicijom mikrobne dekarboksilazne aktivnosti preko stvorenih metabolita mikroorganizama kulture. Neki mikroorganizmi, primjerice bakterijski sojevi *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. i *Micrococcus* spp., prisutni u hrani mogu razgraditi BA u puferskim sustavima kroz aktivnost amin-oksidaza u aerobnim uvjetima (Calzada i sur. 2012.). Leuschner i sur. (1998.) su proučavali mikroorganizme pogodne za fermentaciju hrane s obzirom na njihov potencijal razgradnje histamina i tiramina; od ukupno 64 soja bakterija mliječne kiseline 27 ih razgrađuje histamin, i jedan soj tiramin; 12 od 32 soja *Brevibacterium linens* razgrađuje histamin, a 16 tiramin; 12 od 44 sojeva *Micrococcus* spp. razgrađuje histamin, i 15 sojeva tiramin, dok niti jedan od 20 sojeva *Staphylococcus carnosus* ne degradira histamin ili tiramin. Od svih testiranih sojeva, bakterija *Micrococcus varians* LTH 1540 pokazuje najveću aktivnost tiramin-oksidaže. Osim bakterija, i većina kvasaca je sposobna razgraditi tiramin i histamin tijekom zrenja sireva. U njih ubrajamo vrste *Candida lambica*, *C. krusei*, *C. lipolytica* i ostale *Candida* spp., *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Saccharomyces unisporus* i *Trichosporon beigelii*, a poneki autori navode i kvasac *Geotrichum candidum* za kojeg je poznato kako ima sposobnost sinteze histamina (Nunez i Medina 2016.).

Tvorba bakteriocina u istraživanju Tabanelli i sur. (2014.) se pokazala kao važan čimbenik kontrole neželjene akumulacije BA. Sojevi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* VR84 i EG46 sintetiziraju nizin Z i lacticin 481 koji imaju inhibitorno djelovanje na rast bakterije *Enterococcus faecalis* EF37, koja proizvodi tiramin, i *Streptococcus thermophilus* PRI60, proizvođača histamina. Akumulacija tiramina i histamina je značajno manja u prisustvu laktokoka zbog njihovog antimikrobnog učinka na spomenute bakterijske sojeve. Međutim, dobro je poznato kako upotreba starter kultura sama po sebi ne može biti dovoljna za smanjenje ili inhibiciju sinteze BA u siru, zbog toga se moraju u obzir uzeti i svi prethodno navedeni tehnološki čimbenici kako bi se osigurala kontrola.

Tablica 3.4.1. Učinak raznih parametara na akumulaciju biogenih amina u siru
(Izvor: Nunez i Medina 2016.)

Parametri	Mehanizam
Smanjuju akumulaciju	
Pasterizacija	Uklanjanje dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama
Baktofugacija	
Homogenizacija pod visokim tlakom	
Povećavaju akumulaciju	
Termizacija mlijeka	Nedovoljno visoke temperature
Primjena visokog tlaka na mlijeko	Povećanje količine slobodnih aminokiselina kao prekursora
Duže trajanje zrenja	Veći udio slobodnih aminokiselina i produžena aktivnost dekarboksilaza
Proteolitički enzimi	Veći udio slobodnih aminokiselina u siru
Visoke temperature zrenja	Veći udio slobodnih aminokiselina i veća aktivnost dekarboksilaza u siru
Akumulacija je varijabilna	
Starter kultura	Veći učinak na proteolizu i niži pH sira, inhibicija dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama
Prešanje sira	Veći udio slobodnih aminokiselina, inaktivacija dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama i njihovih enzima

3.5. Određivanje biogenih amina u siru

Potreba za pouzdanim i efikasnim metodama za detekciju i kvantifikaciju biogenih amina u hrani javlja se da bismo bolje razumjeli i upravljali nastankom ovih spojeva. U području nadzora i analize udjela BA ima još mnogo prostora za unaprjeđenje kako bi se kontrola mogla vršiti u realnim uvjetima proizvodnje što učestalije i na što većem broju uzoraka. Kao što je već objašnjeno, formiranje BA mikrobnom dekarboksilacijom aminokiselina može dovesti do toksičnih reakcija koje kod ljudi izazivaju poteškoće u disanju, osip, migrenu, povraćanje ili hipertenziju. Razmatraju se mjere kojima se smanjuje njihova razina i/ili sprječava njihov nastanak u hrani. Osim što su potencijalno toksični, BA se mogu koristiti za provjeru procesa proizvodnje hrane te kao mjere kakvoće i kvalitete sirovina i gotovih

proizvoda, stoga je od velikog značaja i važnosti pratiti njihovu koncentraciju u uzorcima hrane primjenom analitičkih metoda (Papageorgiou i sur. 2018.; Loizzo i sur. 2013.). Identifikacija BA predstavlja jedan od najvećih izazova u analizi hrane, razlog je njihov izrazito jak polarni karakter što rezultira većom topljivošću u vodi nego u organskim otapalima koja se često koriste prilikom ispitivanja, promjenjiv raspon koncentracija, istovremeno pojavljivanje više različitih BA, složenost matrice uzoraka koji se ispituju, prisustvo interferirajućih sojeva te odsustvo intrinzičnih svojstava koja bi omogućila njihovu detekciju uobičajenim analitičkim metodama poput spektrofotometrijske, fluorometrijske ili elektrokemijske metode (Papageorgiou i sur. 2018.). Metode koje se koriste u kvantifikaciji BA mogu se podijeliti na metode koje se temelje na određivanju samih BA te na one koje detektiraju mikroorganizme sa sposobnošću tvorbe BA (Loizzo i sur. 2013.).

Metode za određivanje biogenih amina uključuju ekstrakciju, derivaciju, separaciju i kvantifikaciju. Ekstrakcija i derivatizacija su kritični koraci analitičkog procesa koji mogu dovesti do pogrešaka i gubitaka u određenoj koncentraciji analita zbog čega se u posljednje vrijeme izvode istovremeno (Papageorgiou i sur. 2018.). Perklorna kiselina, trikloroctena kiselina (TCA), klorovodična kiselina (HCl) te organska otapala poput etanola ili metanola su ekstrakcijska sredstva koja se široko koriste za odvajanje amina od matrice uzorka (Nunez i Medina 2016.). S obzirom da većina BA nema mogućnost UV apsorpcije niti fluorescencije, većina metoda zahtijeva da se prije same detekcije BA derivatiziraju sredstvima kao što su dansil-klorid, dabsil-klorid, benzoil-klorid, o-ftalaldehid, fenilzotocijanat, fluorescein-izotocijanat, itd. (Restuccia i sur. 2011.). Svrha njihove provedbe nije samo uklanjanje spojeva koji mogu ometati izvođenje analize već i koncentriranje analita. Nakon ekstrakcije, i po potrebi derivatizacije, određivanje BA se najčešće provodi kromatografskim metodama kao što su tankoslojna kromatografija (TLC), plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) te kapilarna elektroforeza (CE) (Papageorgiou i sur. 2018.). TLC metoda se koristi u svrhu rutinske kontrole zbog svoje jednostavnosti, brzine i primjenjivosti na brojne uzorke u kratkom vremenskom periodu, međutim, jednako kao i GC metoda, ne koristi se često. Zbog visoke detekcije, točnosti i jednostavnosti rukovanja, HPLC metoda je našla široku primjenu te je najčešće korištena metoda za analizu biogenih amina u siru. Postupak izvođenja sastoji se u injektiranju otopine uzorka koji sa mobilnom fazom, koja djeluje kao nosač, putuje kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom pod visokim pritiskom, što dodatno povećava djelotvornost odvajanja. U mobilnoj fazi dolazi do razdvajanja smjese uzorka na sastavne komponente koje se zadržavaju u koloni, a na temelju vremena zadržavanja moguće je identificirati pojedinu komponentu. Položaj pika na vremenskoj osi služi za identifikaciju sastojka, odnosno, dokazivanje kvalitativnog sastava uzorka, dok se na temelju površine ispod pika ili njegove visine dobiva kvantitativna procjena sastojka u uzorku. Određivanje pojedinačnih BA provodi se na osnovu usporedbe između korištenog standarda i pojedinog biogenog amina te njegove poznate masene koncentracije (Meštrović 2016.). Tradicionalne HPLC metode omogućuju određivanje širokog spektra BA, ali vrijeme potrebno za provođenje analize je relativno dugo, između 20 i 60 minuta po uzorku, pa se upotrebom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC)

drastično smanjuje vrijeme uz povećanje detekcije i osjetljivosti analize. Liozzo i sur. (2013.) navode kako su Latorre-Moratella i sur. (2009.) potvrdili brzinu, preciznost i svestranost UHPLC metode koja je omogućila određivanje 12 BA u uzorku sira za manje od 7 minuta, skraćivanje vremena izvođenja analize bilo je između 5 i 11 puta manje u usporedbi s konvencionalnim HPLC postupcima. Osim što omogućuje analizu velikog broja uzorka u kratkom vremenskom periodu, troši se i manja količina otapala što je u skladu s kriterijima održivosti okoliša. Obzirom da biogeni amini potječu od aminokiselina, predložena je HPLC metoda s reverznom fazom koja omogućuje istodobno otkrivanje obje vrste spojeva. Nakon derivatizacije s dansil-kloridom utvrđena je prisutnost kadaverina, histamina, triptamina i tiramina te njihovih prekursorskih aminokiselina u polutvrdom kravljem i ovčjem siru čime je dokazana povezanost između sinteze BA i dostupnih aminokiselina u siru (Loizzo i sur. 2011.).

Restuccia i sur. (2011.) su predstavili novu LC metodu u kombinaciji s *evaporative light-scattering* detektorom (ELSD) čiji se odgovor temelji na količini svjetlosti nastalom uslijed raspršenosti čestica analita dobivenih isparavanjem otapala prilikom prolaska kroz svjetlosnu zraku. Prema tome, dobiveni signal odgovara svim spojevima prisutnim u uzorku koji ne isparavaju ili se ne razgrađuju tijekom isparavanja otapala ili mobilne faze, što omogućuje određivanje svake otopljene tvari manje hlapljivosti od otapala. Nadalje, spojevi koji se analiziraju ne moraju sadržavati kromofor zbog čega nije potrebno provesti derivatizaciju, kao kod ostalih metoda, izbjegavajući time nedostatke tog analitičkog postupka, osim toga, aparatura korištena za izvedbu analize cjenovno je pristupačnija, od primjerice masenih spektrometra, te je kompatibilna sa širokim rasponom otapala. Kod sireva s visokim udjelom masti, proteina, peptida, slobodnih aminokiselina i anorganskih kationa otežano je određivanje BA, više negoli u ostalim matricama hrane. Na učinkovitost analize mogu utjecati i visoka varijabilnost koncentracije biogenih amina što ovisi o vrsti i podrijetlu sira, uvjetima proizvodnje i zrenja, te mikroflori i enzimskoj aktivnosti koja je prisutna u siru (Nunez i Medina 2016.). Stoga se u takvim slučajevima koristi drugačiji pristup određivanja BA preko detekcije dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama u siru.

Budući da je proizvodnja BA soj specifična, razvile su se metode kojima je moguće detektirati bakterijske sojeve koji imaju sposobnost aminokiselinske dekarboksilacije, što može biti korisno sredstvo u procjeni rizika od nastanka BA u hrani. U početku su se metode temeljile na korištenju diferencijalnih medija s pH indikatorom za identifikaciju sojeva koji proizvode BA, međutim, takve metode zahtijevaju izolaciju i rast mikroorganizama zbog čega su mukotrpne i dugotrajne (Loizzo i sur. 2011.), te mogu dati lažno pozitivne reakcije, zbog formiranja drugih alkalnih spojeva, ili lažno negativne reakcija, zbog fermentacijske aktivnosti nekih bakterija. Stoga su molekularne metode za detekciju dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama bolja i točnija alternativa u odnosu na kultivacijske analize (Nunez i Medina 2016.). Potreba za karakterizacijom gena koji kodiraju enzime za dekarboksilaciju je dovela do razvoja metoda koje se temelje na reakciji lančane polimeraze, odnosno, PCR metodi (eng. *Polymerase Chain Reaction*). Aminoacil-dekarboksilaza gen, kojeg sadrže dekarboksilaza-pozitivni mikroorganizmi, se koristi za oblikovanje specifičnih početnica koje služe za njihovu detekciju pomoću PCR-a. Tako su razvijene početnice za

detekciju tiramin-formirajućih BMK, histamin-formirajućih Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija te su predložene početnice za detekciju kadaverin i putrescin-formirajućih bakterijskih sojeva. Ukoliko nam je potrebno preciznije određivanje možemo koristiti kvantitativnu PCR (q-PCR) koja omogućuje kontinuirano praćenje cjelokupnog procesa umnažanja; tako je ova metoda bila primijenjena u svim fazama proizvodnje sira i u konačnom proizvodu te je unutar 2 sata detektirana prisutnost soja sa sposobnošću sinteze histamina (Loizzo i sur. 2011.). Razvijena je i multiplex (višestruka) PCR metoda koja omogućuje istovremenu analizu više segmenata istog uzorka DNA koristeći više parova početnica te je moguće otkriti proizvođače histamina, tiramina, putrescina i kadaveina u širokom rasponu Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, čime se postiže istovremena detekcija gena koji kodiraju nekoliko aminokiselinskih dekarboksilaza (Nunez i Medina 2016.). Takve metode su brze i osjetljive, mogu se koristiti u bilo kojoj fazi proizvodnje sira te omogućuju detekciju mikrobnih proizvođača prije nego što razine BA dosegnu onu koncentraciju koja se može otkriti analitičkim metodama (Nunez i Medina 2016.) što može pomoći u sprječavanju akumulacije BA u konačnom proizvodu i odabiru dekarboksilaza-negativnih sojeva bakterija mliječne kiseline kao starter kulture u proizvodnji sira (Loizzo i sur. 2011.).

4. Zaključak

Učinak biogenih amina, bio pozitivan ili negativan, ovisi o individualnim osobinama potrošača zbog čega je teško definirati gornju granicu njihovog unosa. Zdravi pojedinci mogu konzumirati sir koji sadrži relativno visoke koncentracije BA bez nastanka ozbiljnih simptoma zbog toga što posjeduju učinkovit sustav detoksikacije, odnosno, sposobni su ih razgraditi preko prirodno prisutnih amin-oksida. Međutim, u današnje su vrijeme mliječni proizvodi dostupni širom svijeta, a sukladno tome se povećava i broj potrošača, uključujući djecu, trudnice, starije osobe, osobe sa zdravstvenim problemima ili slabim imunološkim sustavom, te raste rizik od pogrešaka u proizvodnom lancu zbog čega je izuzetno važno uspostaviti kontrolu i spriječiti prekomjernu akumulaciju. Prisutnost BA je, nesumnjivo, obilježje nepravilnih i nehigijenskih postupaka u proizvodnji, distribuciji i skladištenju sira, a čimbenici poput niske pH vrijednosti, više temperature, primjene visokog tlaka i dužeg zrenja, koji mogu uzrokovati veći stupanj proteolize, dodatno pospješuju njihovu prekomjernu sintezu. Ona je u siru u određenoj mjeri i neizbježna obzirom da se mnogi tehnološki parametri ne mogu lako modificirati jer su blisko povezani s procesom fermentacije i zrenja, stoga se važno usmjeriti na postupak smanjenja broja dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama tijekom proizvodnje sira. To se može postići primjenom tehnoloških postupaka kao što su pasterizacija, homogenizacija i baktofugacija mlijeka, dodatkom soli, smanjenjem vremena trajanja zrenja i pravilnom njegom sira. Ipak, kao najbolja opcija se pokazao odabir starter kultura koje nemaju mogućnost tvorbe BA ili koje mogu oksidirati prisutne BA u proizvodu, te preko stvorenih metabolita inhibirati mikrobnu dekarboksilaznu aktivnost. To je izuzetno važno zbog toga što su aminokiselinske dekarboksilaze, odgovorne za proizvodnju BA, stabilne i aktivne u širokom rasponu okolišnih uvjeta, čak i kada su oslobođane u siru nakon lize stanica. Ne postoji jedinstven ili specifičan postupak za smanjenje rizika, ali se mogu poduzeti različite mjere kojima se ograničava akumulacija biogenih amina u siru. Prihvatljiv konačni rezultat može se postići samo moduliranjem gore razmatranih faktora s ciljem inhibicije rasta dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama i aktivnosti njihovih enzima.

5. Popis literature

1. Andic S., Genccelep H., Kose S. (2010a). Determination of Biogenic Amines in Herby Cheese. *International Journal of Food Properties*, 13:6, 1300–1314.
2. Andic S., Genccelep H., Tunctürk Y., and Köse S. (2010b). The effect of storage temperatures and packaging methods on properties of Motal cheese. *Journal of Dairy Science*, 93, 849–859.
3. Bunkova L., Bunka F., Mantlova G., Čablova A., Sedlaček I., Švec P., Pachlova V., Kračmar S. (2010). The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*, 27, 880–888.
4. Burdychova R., Komprda T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 276, 149–155.
5. Calzada J., Del Olmo A., Picon A., Gaya P., Nunez M. (2012.) Proteolysis and biogenic amine buildup in high-pressure treated ovine milk blue-veined cheese. *Journal of Dairy Science*, 96, 4816–4829
6. Calzada J., Del Olmo A., Picon, A., Gaya P., Nuñez M. (2013). Reducing biogenic amine-producing bacteria, decarboxylase activity and biogenic amines in raw milk cheese by high pressure treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 1277–1283.
7. Deng Y., Man C., Fan Y., Wang Z., Li L., Ren H., Cheng W., Jiang, Y. (2015). Preparation of elemental selenium-enriched fermented milk by newly isolated *Lactobacillus brevis* from kefir grains. *International Dairy Journal*, 44, 31–36.
8. Glória M.B.A. (2005). Bioactive amines. U: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, Vol. 4 (Ur. Hui Y. H., Sherakt F.), Taylor & Francis group, Florida, USA, 13, 1–32.
9. Herrero-Fresno A., Martínez N., Sánchez-Llana E., Díaz M., Fernández M., Cruz Martín M., Ladero V., Alvarez M.A. (2012). *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 297–304.
10. Innocente N., D’agostin P. (2002). Formation of Biogenic Amines in a Typical Semihard Italian Cheese. *Journal of Food Protection*, 65, 1498–1501.
11. Komprda T., Smela D., Novicka K., Kalhotka L., Šustova K., Pechova P. (2007). Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*, 102, 129–137.

12. Ladero V., Calles-Enríquez M., Fernández M., Alvarez M.A. (2010). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6, 145–156.
13. Leuschner R.G.K., Heidel M., Hammes, W.P. (1998). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 1–10.
14. Linares D.M., Cruz Martín M., Ladero V., Alvarez M.A., Fernández M. (2011). Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 691–703.
15. Loizzo M.R., Menichini F., Picci N., Puoci F., Spizzirri U.G., Restuccia D. (2013). Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 38–55.
16. Marija Meštrović (2016.) Pročišćavanje ekstrakata ribe u svrhu analize udjela histamina raman spektroskopijom. Diplomski rad, Zagreb.
17. Mayer H. K., Fiechter G. (2018). UHPLC analysis of biogenic amines in different cheese varieties. *Food Control*, 93, 9–16.
18. Moreira G. M.M., Costa R.G.B., Teodoro V.A.M., Paula J.C.J., Sobral D., Fernandes C., & Gloria M.B.A. (2018). Effect of ripening time on proteolysis, free amino acids, bioactive amines and texture profile of Gorgonzola-type cheese. *Food science and technology*, 98, 583–590.
19. Novella-Rodríguez S., Veciana-Nogués M.T., Roig-Sagués 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.
20. 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.
21. Nunez M., Medina M. (2016). Reference module in Food Science, Elsevier Inc., USA.
22. Ordoñez A. I., Ibañez F. C., Torre P., Barcina Y. (1977). Formation of biogenic amines in Idiazábal ewe's-milk cheese: effect of ripening, pasteurization and starter. *Journal of Food Protection*, 60, 1371–1375.
23. Pachlova V., Bunka F., Flasarova R., Valkova P., Bunkova L. (2012). The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. *Food Chemistry*, 132, 1846 – 1854.

24. Papageorgiou M., Lambropoulou D., Morrison C., Kłodzińska E., Namieśnik J., Płotka-Wasyłka J. (2018). Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *Trends in Analytical Chemistry*, 98, 128–142.
25. 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(6), 631–640.
26. Restuccia D., Spizzirri U. G., Puoci F., Cirillo G., Curcio M., Parisi O. I., Cirillo G., Curcio M., Parisi O. I., Iemma F., Picci N. (2011). A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. *Talanta*, 85(1), 363–369.
27. Sanli T., Senel E. (2015). Formation of Biogenic Amines in Cheese. *Processing and Impact on Active Components in Food*, 27, 223–230.
28. Shalaby A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29 (7), 675–690.
29. Silla Santos M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213–231.
30. Tabanelli G., Montanari C., Bargossi E., Lanciotti R., Gatto V., Felis G., Torriani S., Gardini F. (2014). Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 14–23.
31. Tabanelli G., Montanari C., Gardini F. (2018). Biogenic Amines in Food: A Review of Factors Affecting Their Formation. *Reference Module in Food Science*.
32. Tofalo R., Perpetuini G., Schirone M., Suzzi G. (2016). Biogenic Amines: Toxicology and Health Effect. U: *Encyclopedia of Food and Health* (Ur. Caballero B., Finglas P. M., Toldra F.). Elsevier Ltd., Oxford, UK, 424–429.
33. Torracca B., Pedonese F., López M. B., Turchi B., Fratini F., Nuvoloni R. (2016). Effect of milk pasteurisation and of ripening in a cave on biogenic amine content and sensory properties of a pecorino cheese. *International Dairy Journal*, 61, 189–195.
34. Valsamaki K., Michaelidou A., Polychroniadou A. (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*, 71, 259–266.

6. Prilog

Popis korištenih poveznica:

Eurostat – Državni zavod za statistiku

https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk_and_milk_product_statistics#Milk_products
(pristupljeno 25.03.2019.)

<https://www.medicalnewstoday.com/articles/318337.php> (pristupljeno 22.05.2019.)

Životopis

Dora Herljević rođena je 01.09.1993. godine u Rijeci. Završila je osnovnu školu u Ravnoj Gori, nakon čega pohađa Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Delnicama. 2013. godine upisuje preddiplomski stručni studij prehrambene tehnologije na Veleučilištu u Karlovcu kojeg završava 2017. godine obranom završnog rada na temu „Utjecaj planiranja prehrane na energetske i hranjive vrijednosti mlijeka i mliječnih proizvoda u cjelodnevnim obrocima dječjih vrtića“ pod vodstvom mentorice dr. sc. Ines Cindrić. U sklopu studija 2016. godine završava tečaj za degustatora sira. Nakon završenog studija u Karlovcu, 2017. godine upisuje diplomski studij „Proizvodnja i prerada mlijeka“ na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja radi na raznim poslovima i promocijama mlijeka i mliječnih proizvoda čime usavršuje svoje znanje iz istih.