



# Kapitel I

## 1 Zusammenfassung

Für den aufgeklärten Weinkonsument von heute rückt der gesundheitliche Aspekt immer mehr in den Blickpunkt. Ein erhöhter Gehalt an biogenen Aminen in Wein entspricht somit nicht den aktuellen Marktanforderungen. Während der letzten Jahre führten die klimatischen Veränderungen aber auch neuere oenologische Praktiken wie die Maischestandzeit weißer Trauben zu einem Anstieg der pH-Werte im Most. Dies führt zu einer Verbesserung der Lebensbedingungen und somit Profilierung unterschiedlicher Bakterien. Gleichzeitig nimmt die mikrobiozide Wirkung der SO<sub>2</sub> mit dem pH-Anstieg deutlich ab. Folglich steigt auch die Gefahr der bakteriellen Bildung biogener Amine. Damit auch weiterhin deutsche Weine den qualitativen Anforderungen entsprechen, war es Ziel dieser Arbeit während allen Etappen der Weinbereitung die Einflussfaktoren, die zur Bildung biogener Amine führen, zu untersuchen.

Biogene Amine entstehen in Wein vorrangig nach Decarboxylierung der korrespondierenden Aminosäuren durch bakterielle Aktivität. Die Bildung der, vor allem aus gesundheitlichen Aspekten, unerwünschten biogenen Amine beruht auf einer Vielzahl von Einflussfaktoren, die von der Beschaffenheit des Lesgutes (Trauben) über die Art der Kellerwirtschaft bis hin zum Ausbau bzw. der Reifung des Weines reichen. Diese multiplen Faktoren wurden im Rahmen dieser Arbeit bezüglich ihres Einflusses auf die Bildung ausgewählter biogener Amine untersucht. Die Bestimmung des Gehaltes der biogenen Amine Histamin, Putrescin, Cadaverin, Phenylethylamin, Tyramin,  $\beta$ -Alanin, Agmatin, Isoamylamin und Ethanolamin erfolgte mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion (HPLC-FD) nach Festphasenextraktion (SPE) und Vorsäulenderivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd und 2-Mercaptoethanol über den internen Standard Heptylamin.

In dieser Arbeit gelang es bei umfassenden Untersuchungen über zwei Jahrgänge zahlreiche Ursachen für die Bildung biogener Amine aufzuklären und daraus präventive und kurative Maßnahmen abzuleiten. Diese Untersuchungen erfolgten anhand realer Traubenproben, Mosten und Weinen, wobei alle Weinbereitungsschritte unter Praxisbedingungen sukzessiv verfolgt wurden. Die in dieser Form bisher nicht publizierte Durchführung manigfaltiger Technikumsversuche unter kontrollierten Bedingungen ermöglicht die konkrete Aussage über die



Einflussfaktoren, die während der Vinifikation der Bildung biogener Amine entgegenwirken oder diese fördern. Es konnte eindeutig geklärt werden, dass die Traubenfäulnis zu erhöhten Gehalten biogener Amine im Most führt. Dabei erwiesen sich gezielte Inokulationen von gesunden Trauben mit unterschiedlichen Pilzsporen als innovativer Ansatz, um die negative Auswirkung der Fäulnis zu untersuchen. Im Verlauf der Fermentationsprozesse ist der biologische Säureabbau (BSA) bzw. die malolaktische Gärung, verbunden mit unerwünschter bakterieller Metabolitbildung, die Hauptquelle für die Bildung biogener Amine. Als Schlüsselfaktor für die Bildung biogener Amine konnte der pH-Wert identifiziert werden. So erwiesen sich hohe pH-Werte als förderlich für die Bildung biogener Amine. Auffällig war die Tatsache, dass es vor allem bei Rotweinen bei Überschreiten des pH-Wertes von 3,4 zur verstärkten Bildung biogener Amine kam. Deren Bildung wurde durch einen spontanen BSA und eine späte Gabe schwefliger Säure zusätzlich potenziert. Bei weißen Rebsorten konnte gezeigt werden, dass der Lysozymeinsatz von 150 mg/L nur in Verbindung mit einer zeitnahen Schwefelung der Bildung von biogenen Aminen entgegenwirkt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer lytischer Enzyme mit weitem Wirkungsspektrum gegen Schadbakterien. Grundsätzlich konnte die Notwendigkeit einer optimierten Steuerung der Fermentationsprozesse durch Einsatz von Starterkulturen nachgewiesen werden.

Die Hitzeeinwirkung während der Rotweinvinifikation durch die Maischeerhitzung oder der Jungweine durch Flash-Pasteurisierung wirkte so präventiv, dass die Bildung biogener Amine fast komplett unterbunden werden konnte. Beide präventive Verfahren wurden in ihrer sensorischen Auswirkung auf die Weinqualität überprüft und erwiesen sich als erfolgreiche Strategien, um die mikrobiologische Prozesssicherheit während der Weinbereitung zu erhöhen.

Bei der direkten Abreicherung bereits gebildeter biogener Amine erwies sich das Natrium-Bentonit als das Leistungsfähigste. Insbesondere die hohe Abreicherung des physiologisch bedeutsamsten biogenen Amins, Histamin, ist hervorzuheben. Der bereits bekannte Umstand, dass die Hefe selbst ein äußerst wirkungsvolles Biosorbent darstellt, konnte anhand eines erweiterten Adsorptionsspektrums bestätigt werden. So führte eine Hefeschönung mit gesunder Hefe und der Einsatz eines Hefeautolysats zu einer schonenden Abreicherung biogener Amine.

Aus sensorischer Sicht sind Weine mit geringen Konzentrationen biogener Amine anzuraten. Die sensorische Beurteilung der Versuchsweine zeigte tendenziell eine



mit steigenden Gehalten einhergehende Maskierung von fruchtigen und frischen Noten. Bei den Rotweinen lag eine bisher noch unbekannte Förderung der Adstringenz, grünen Tannine und Bittere durch die biogenen Amine Phenylethylamin und Histamin vor. Der Einsatz der Methode der Temporal Dominance of Sensations (TDS), bei der die Wahrnehmung der Versuchsweine im Mund in Form sensorischer Muster dargestellt wurde, zeigte eine zunehmende Dominanz eines stumpfen/belegenden Empfindens und des Attributes adstringierend bei höheren Gehalten biogener Amine.

Die umfassende sensorische Beurteilung der Versuchsweine ergab einen Einblick auf die Auswirkung der Prozessschritte auf das Endprodukt Wein. Den Weinerzeugern ist es somit möglich, geeignete Maßnahmen zu ergreifen, um das gewünschte Weinprofil zu erzielen.

Nach aktuellem Kenntnisstand liegt mit dieser Arbeit erstmalig eine systematische Untersuchung biogener Amine von der Traube bis hin zum gefüllten und sensorisch beurteilten Wein vor. Für die Weinwirtschaft ergeben sich aus den erarbeiteten Ergebnissen konkrete Strategien: Einsatz von Starterkulturen mit zeitnahe Schwefelung, Flashpasteurisierung zum schonenden Abtöten von Schadorganismen oder die kurative Entfernung biogener Amine mittels Bentonit und Hefezellwänden. Diese ermöglichen der Weinbranche auf prozess- oder klimabedingte Veränderungen schlagkräftig zu reagieren und Weine zu erzeugen, die den Marktanforderungen nach niedrigen Gehalten biogener Amine entsprechen.





## Kapitel II

### 2 Allgemeine Einleitung und Ziele der Arbeit

Biogene Amine sind niedermolekulare, organische Aminobasen mit einer aliphatischen, aromatischen bzw. heterozyklischen Struktur. Manche Amine sind natürlicher Bestandteil lebender Zellen und können somit in Gemüse, Obst, aber auch im menschlichen Organismus nachgewiesen werden [Pfannhauser und Pechanek 1984; Silla - Santos 1996]. In der Traube liegen bereits die biogenen Amine Cadaverin, Putrescin, Spermin, Spermidin und Histamin vor [Vidal-Carou, Ambatlle-Espunyes et al. 1990; Hajos, Sass - Kiss et al. 2000]. Durch biotischen Stress wie Fäulnißbefall des Traubenmaterials, dem unspezifischen Eiweißabbau durch Pilze sowie der Aktivität von Bakterien konnten höhere Aminkonzentrationen zugeordnet werden. Somit liegen schon im Most einige biogene Amine vor. Hauptsächlich aber werden Sie in fermentierten Lebensmitteln in Folge mikrobiologischer Decarboxylierung von Aminosäuren gebildet und werden somit als biogen bezeichnet. Bei der Weinbereitung werden biogene Amine vorrangig durch Milchsäurebakterien mit spezifischen Aminosäuredecarboxylasen gebildet. Einige biogene Amine werden vor allem aufgrund ihrer potentiell gesundheitsschädlichen Wirkung auf den menschlichen Körper als problematisch eingestuft. Das Auftreten biogener Amine in Wein wird mit steigendem Interesse sowohl von Konsumenten als auch Produzenten verfolgt. Auch wenn mittlerweile zahlreiche Faktoren bekannt und eindeutig nachgewiesen sind, die zur Bildung biogener Amine beitragen, sind die Zusammenhänge zwischen der Entstehung biogener Amine und den Faktoren, die das quantitative und qualitative Auftreten beeinflussen derzeit noch nicht eindeutig geklärt. Speziell für die deutsche Weinwirtschaft ist die Datengrundlage bezüglich des Auftretens biogener Amine in Wein dürftig. Die nachweisbare Klimaveränderung und die damit einhergehende Reifeverfrühung begünstigt durch hohe pH-Werte und Traubenfäulnis die Entwicklung von unterschiedlichen Bakterienspezies, die ein erhöhtes Schädigungspotential für den Wein besitzen. Daher gewinnt das Thema zusätzlich an aktueller Relevanz. Die in der Literatur aufgeführten Parameter, die zu einer erhöhten Bildung biogener Amine in Wein führen, basieren in der Regel entweder auf in vitro-Versuchen oder beziehen sich auf Weine aus dem Lebensmitteleinzelhandel. Insgesamt beruht der aktuelle Kenntnisstand nur in geringem Umfang auf Versuchen, die unter kontrollierten



Weinbereitungsbedingungen systematisch unterschiedliche Faktoren der Bildung biogener Amine beleuchten. Das Ziel dieser Arbeit war es, von der Traube bis zum gefüllten Wein bei typischen deutschen weißen als auch roten Rebsorten unter Anwendung üblicher oenologischer Verfahren, die Parameter zu untersuchen, die zur Bildung biogener Amine führen. So wurden die Einflüsse der Traubenfäulnis, des pH-Wertes sowie unterschiedliche Durchführungen der Fermentationsprozesse, die von der Spontangärung und dem spontanen BSA bis hin zum vollständigen Einsatz von Starterkulturen reichen, untersucht. Gleichzeitig wurden technologische Maßnahmen bewertet die der Qualitätsminderung von Wein durch hohe Gehalte biogener Amine entgegengewirken. Hierbei wurden thermische Verfahren wie die Maischeerhitzung und die Flash-Pasteurisierung als auch der Einsatz von Lysozym evaluiert. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag zudem in der Entwicklung kurativer Strategien, um bereits gebildete biogene Amine wieder zu entfernen. Mittels klassischen und neuartigen sensorischen Methoden wurden die Versuchsweine untersucht. Dies sollte es ermöglichen, präventive als auch kurative Strategien hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die sensorisch wahrzunehmende Produktqualität zu bewerten. Ebenso sollte in dieser Arbeit der, häufig biogenen Aminen zugeschriebene, Einfluss auf die Maskierung des Sortenaromas und deren Beitrag zur Bildung unspezifischer Weinfelder wissenschaftlich untersucht werden.



## Kapitel III

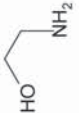
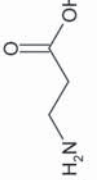
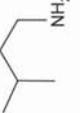
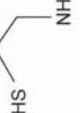


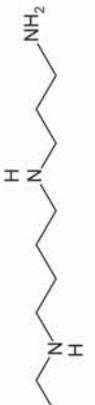
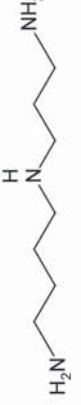
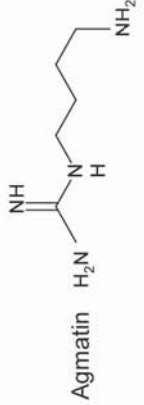

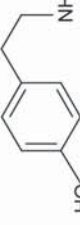
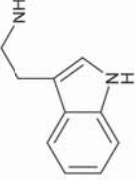
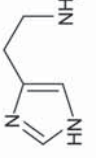
### 3 Literaturüberblick

Der Prozess der Weinherstellung ist zwingend mit mikrobiologischen Aktivitäten verbunden. Die Hefen, verantwortlich für die alkoholische Gärung, gehören hierbei ebenso zur Mikroflora des Weines, wie Milch- und Essigsäurebakterien. Von Letzteren sind zurzeit 25 verschiedene Arten im Wein beschrieben, die den Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* und *Weissella* zuzuordnen sind [König und Fröhlich 2008]. Milchsäurebakterien weisen zum Teil Stoffwechselaktivitäten auf, die bei der Weinbereitung erwünscht sind: Dazu gehört der Abbau von Malat beim biologischen Säureabbau. Gleichzeitig sind sie aber auch für die Bildung von Fehltonen verantwortlich [Bartowsky 2009]. So gehen die aromawirksamen Verbindungen wie Essigsäure, Ester, flüchtige Phenole und die an Mäuseharn erinnernden Pyridine und Pyrroline aus dem Metabolismus von Milchsäurebakterien hervor [Dittrich und Großmann 2005]. Weitere unerwünschte Nebenprodukte sind biogene Amine.

#### 3.1 Biogene Amine – chemische Grundlagen und Bildungswege

Biogene Amine sind niedermolekulare, organische Basen, welche eine oder mehrere Aminogruppen als funktionelle Gruppe aufweisen. Man kann sie nach der Anzahl der Aminogruppen [Bover-Cid, Iquierdo-Pulido et al. 2006] oder nach ihrer Struktur (aliphatische -, heterozyklische - oder aromatische Amine) einteilen (Tabelle 1). Biogene Amine werden im normalen Stoffwechsel von Tieren, Menschen und Pflanzen bei metabolischen Aktivitäten lebender Zellen gebildet [Askar und Treptow 1986]. Ihre Namensgebung verdanken sie den als Präkursoren dienenden Aminosäuren, wohingegen das Präfix „biogen“ (griech. *bios* = Leben) auf ihren Bildungsweg hindeutet. Biogene Amine sind somit Amine, die aus dem Stoffwechsel von lebenden Zellen stammen.

Tabelle 1: Strukturformeln ausgewählter biogener Amine

Monoamine	Diamine	Polyamine
<p>Ethanolamin  </p> <p>β-Alanin  </p> <p>Isoamylamin  </p> <p>Cysteamin  </p>	<p>Putrescin  </p> <p>Cadaverin  </p>	<p>Spermin*  </p> <p>Spermidin*  </p> <p>Agmatin  </p>
<p>Aliphatische Amine</p>		
<p>Aromatische Amine</p> <p>β-Phenylethylamin  </p> <p>Tyramin  </p>		
<p>Heterozyklische Amine</p> <p>Tryptamin  </p> <p>Histamin  </p>		

\* In dieser Arbeit nicht untersuchten biogenen Amine







Für die Bildung biogener Amine sind drei Wege beschrieben [Askar und Treptow 1986].

- Die Decarboxylierung von Aminosäuren
- Die reduktive Aminierung und die Transaminierung von Aldehyden und Ketonen
- Der hydrolytische Abbau stickstoffhaltiger Verbindungen

Hierbei spielt bei der Weinbereitung die Decarboxylierung von Aminosäuren die bedeutendste Rolle [Ancin-Azpilicueta, Gonzalez-Marco et al. 2008], wobei Bast [Bast 1971] bei drei Bakterienstämmen auch die Aldehydaminierung nachwies.

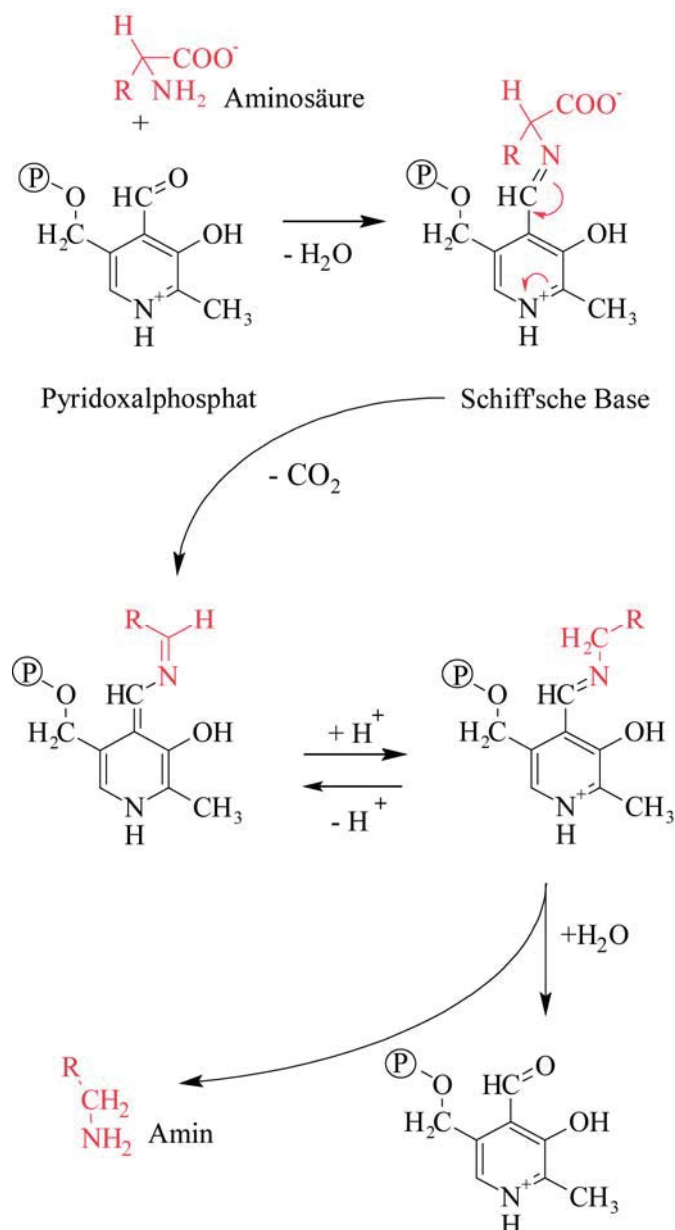


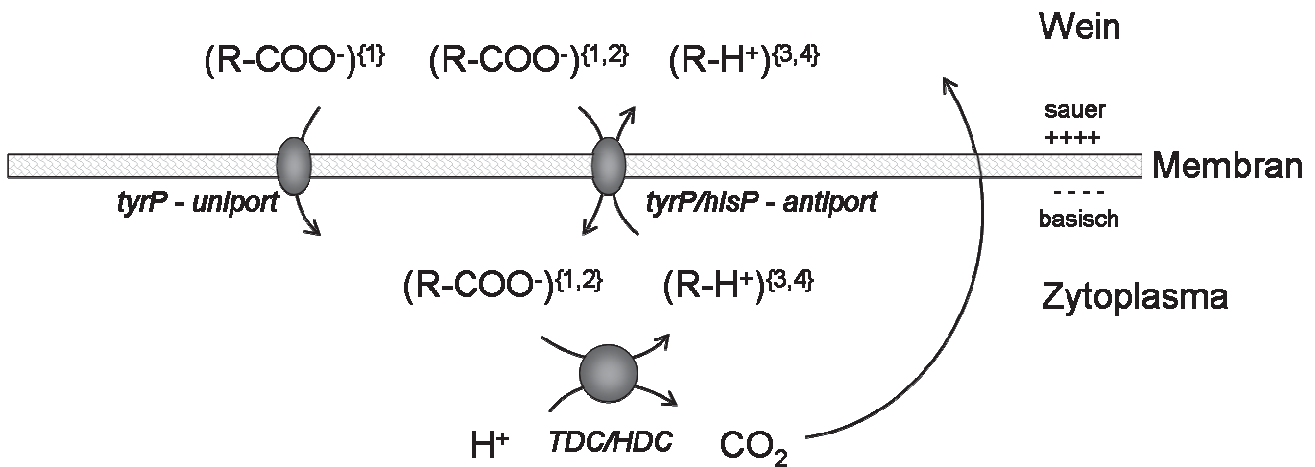
Abbildung 1: Schematische Darstellung der Decarboxylierung von Aminosäuren (verändert nach [Askar und Treptow 1986; Millies 1989; Keller 1993])



Die Decarboxylierung von Aminosäuren erfolgt wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt meist unter Beteiligung von Pyridoxalphosphat als Cofaktor, wobei auf diesem Weg die primären biogenen Amine gebildet werden [Askar und Treptow 1986; Millies 1989; Keller 1993]. Dieser Bildungsweg gilt exemplarisch sowohl für die durch Mikroorganismen in Lebensmitteln als auch für die im menschlichen Organismus gebildeten biogenen Amine. Die Decarboxylierung erfolgt durch katalytische Wirkung der meist spezifischen Aminosäuredecarboxylasen. Pyridoxalphosphat bildet zusammen mit der Aminosäure nach Wasserentzug eine „Schiffsche Base“. Bedingt durch den Elektronenmangel im Pyridinring und die daraus folgende Elektronen anziehenden Wirkung des positiv geladenen Pyridinstickstoffs entsteht ein Elektronenfluss, der zur Eliminierung eines Kations am  $\alpha$ -C-Atom der Aminosäure führt, in der Regel die Abspaltung der Carboxylgruppe (Decarboxylierung). Durch Addition eines Protons ( $H^+$  - Ion) am  $\alpha$ -C-Atom der Aminosäure wird wieder eine „Schiffsche Base“ mit Pyridin-Struktur gebildet. Aus dieser entstehen durch Spaltung nach Wasseranlagerung (Hydrolyse) das entsprechende biogene Amin und das ursprüngliche Pyridoxalphosphat. Diese Decarboxylasen sind meist für die jeweilige L-Form der Aminosäuren spezifisch. Auch wenn diese Enzyme in tierischem und pflanzlichem Gewebe weit verbreitet sind, so zeigen diese Decarboxylasen vor allem bei Bakterien eine erhebliche Aktivität. Spezifisch sei auf zwei in der Literatur ausführlich beschriebene Decarboxylierungsreaktionen durch Bakterien eingegangen. Die Decarboxylierung von Histidin unter Bildung von Histamin sind für *Lactobacillus buchneri* [Molenaar, Bosscher et al. 1993], die Umwandlung von Tyrosin zu Tyramin bei *Lactobacillus brevis* [Wolken, Lucas et al. 2006] nachgewiesen und beschrieben. Moreno-Arribas und Lonvaud (1999) konnten bei *Lactobacillus brevis* IOEP 9809 eine Tyrosin-Decarboxylase (TDC) nachweisen, die ebenfalls Pyridoxalphosphat als Cofaktor benötigt. In beiden Fällen fungieren spezifische Transporter in der Bakterienmembran, entweder als Uniport (Tyrosin) oder als Antiport (Tyrosin und Histidin), als effiziente Austauscher von Substrat (Aminosäure) und Produkt (biogenes Amin), wobei es sich bei Tyrosin/Tyramin um einen speziellen  $Na^+/H^+$  Antiporter handelt [Moreno-Arribas und Lonvaud-Funel 1999]. Nach Moreno-Arribas, Torlois et al. (2000) sind vor allem *Lactobacillus hilgardii* und *Lactobacillus brevis* starke Tyraminbildner, wobei bei *Lactobacillus hilgardii* IOEB 9649 Tyramin und Phenylethylamin gleichzeitig gebildet werden. Schematisch ist der Vorgang des



Transports der Aminosäuren in die Bakterienzelle, die Decarboxylierung und der folgende Transport des biogenen Amins aus der Zelle für beide Aminosäuren in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Schema der Decarboxylierung von Aminosäuren in der Bakterienzelle am Beispiel von Histidin und Tyrosin (verändert nach [Molenaar, Bosschner et al. 1993; Wolken, Lucas et al. 2006]). <sup>1</sup> = Tyrosin; <sup>2</sup> = Histidin; <sup>3</sup> = Tyramin; <sup>4</sup> = Histamin; tyrP = Tyramin-Transporter; hisP = Histamin-Transporter; TDC = Tyrosin-Decarboxylase; HDC = Histidin-Decarboxylase.

Nach Wolken, Lucas et al. (2006) verbraucht die Decarboxylierungsreaktion von Tyrosin, katalysiert durch die TDC, ein Proton, wodurch das Zytoplasma, relativ zum Außenmedium gesehen, im pH angehoben wird. Bei jeder Umwandlung eines Moleküls Tyrosin zu einem Molekül Tyramin wird eine positive Ladung über die Membran nach außen verlagert und ein Proton aus dem Zytoplasma entfernt. Somit handelt es sich bei diesem Vorgang um eine Protonenpumpe, bei der Energie gewonnen wird. Gleichzeitig spielt dieser Aminosäurenmetabolismus eine bedeutende Rolle der zytoplasmatischen pH-Wert-Regulation, so dass die Bakterien mit starker Decarboxylaseaktivität eine höhere Resistenz gegenüber Säurestress aufweisen. Bakterien mit Decarboxylaseaktivität überleben somit länger in Wein als solche, die diese Fähigkeit nicht besitzen [Lonvaud-Funel 2001; Ancin-Azpilicueta, Gonzalez-Marco et al. 2008].

Der nachgewiesene Antiporttransporter *tyrP* katalysiert den elektrogenen Tyrosin/Tyramin Austausch, während die TDC die Decarboxylierung katalysiert. Der ebenfalls nachgewiesene Tyrosin – Uniport ist weniger effizient.

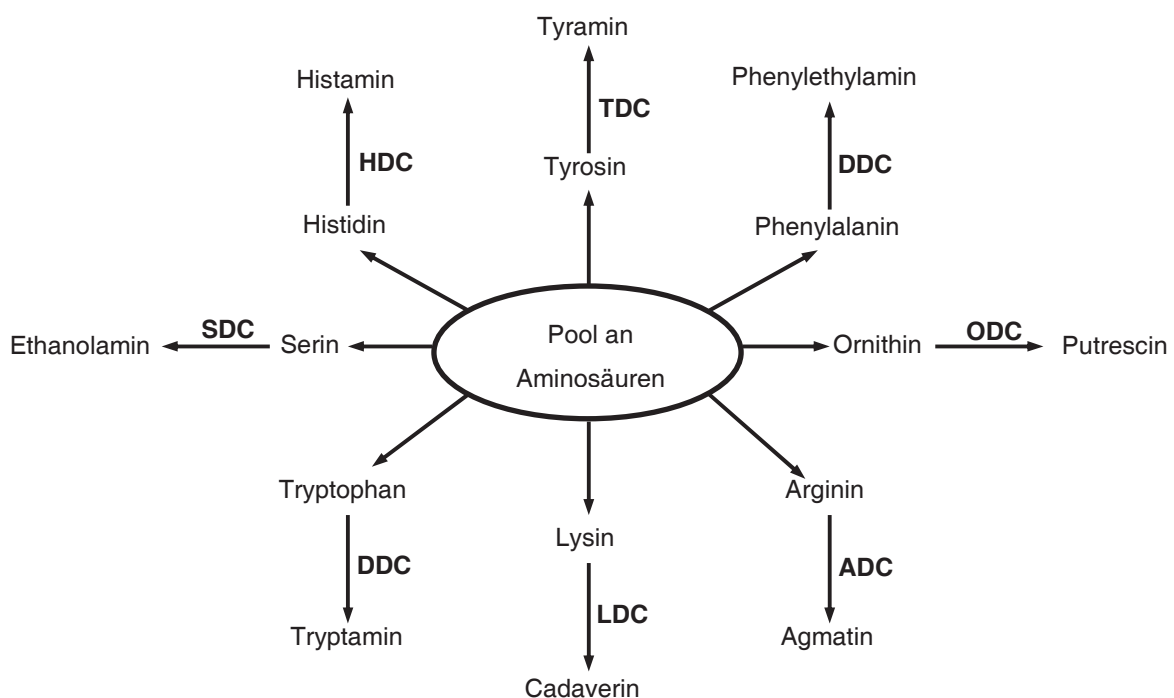
Der Ansatz von Molenaar, Bosschner et al. (1993) geht ebenso von einem Energiegewinn durch die Ausbildung eines Protonengradienten über die Membran aus. Ist das Produkt positiver geladen als der korrespondierende Prekursor wird auf



der Membraninnenseite ein negatives elektrisches Potential aufgebaut. Über den Antiport werden Carbonsäuren (in diesem Fall die Aminosäure Histidin) in die Zelle transportiert, wobei die Carboxylgruppe  $R-COO^-$  die Ladung  $z$  trägt. Im Zytoplasma erfolgt die Decarboxylierung und das decarboxylierte Produkt (das korrespondierende biogene Amin Histamin)  $R-H$  mit der Ladung  $z+1$  wird ausgeschieden. Durch die Ladungsunterschiede (innen negativ, außen positiv) ist dieser Transportmechanismus elektrogen, wobei der Ladungsunterschied zwischen Substrat und Produkt genau ein Proton beträgt. Bei diesem Vorgang verlässt das Kohlendioxid ungeladen die Zelle. Laut Molenaar, Bosscher et al. (1993) wird die HDC bei niedrigem pH-Wert in der späten exponentiellen Wachstumsphase induziert. Ebenso induzieren suboptimale Wachstumstemperaturen die Decarboxylase. Im Gegensatz dazu wird von Landete, Pardo et al. (2006) eine maximale Aktivität von HDC in der frühen exponentiellen Wachstumsphase bei *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus parvulus* und *Oenococcus oeni* festgestellt [Landete, Pardo et al. 2006]. Den gleichen Autoren zufolge erreicht die HDC ihre maximale Aktivität bei Histidinkonzentrationen von 1-2 g/L. Die Zugabe von 0,5 g/L Pyridoxal-5-phosphat führte zu einem Anstieg um mehr als das Doppelte der HDC-Aktivität. Nach Rollan [Rollan, Coton et al. 1995] steigt bei *Lactobacillus hilgardii* die HDC-Aktivität bis zu 10 % (v/v) bei einem einfacheren Transport von Histidin in die Zelle durch die fluidere Membran, wobei ab 12 % (v/v) der Histidintransport in die Zelle wieder abnimmt, um bei 12,5 % (v/v) vollständig zu erliegen. Der Gehalt an Citrat spielt ebenso eine bedeutende Rolle bezüglich der HDC-Aktivität. Bei *Leuconostoc oenos 9204* reduzieren 0,4 g/L Citrat die HDC-Aktivität um 78 %, wobei bei *Lactobacillus hilgardii* die Aktivität gesteigert wird. Das Hauptbildungsprodukt des BSA's, L-Lactat, inhibiert die HDC-Aktivität bei *Leuconostoc oenos 9204* um 22 % durch eine Reduzierung des Histidinimports. Glucose hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Da Citrat während des BSA's abgebaut wird und L-Lactat die Aktivität nur um 22 % reduziert, kann die weitere Bildung von Histamin während der Reifung von Wein erklärt werden [Lonvaud-Funel und Joyeux 1994]. Soufleros [Soufleros, Barrios et al. 1998] konnten hingegen bis auf Putrescin und Phenylethylamin nur eine negative Korrelation aller biogener Amine mit dem Malat- und Citratgehalt feststellen. Die Bedingungen unter denen biogene Amine entstehen scheinen insgesamt sehr komplex zu sein. Selbst wenn ihr quantitatives Entstehen unter standardisierten Bedingungen und ausgewählten Bakterienstämmen oder Gattungen untersucht



wurde, so verhalten sich die einzelnen biogenen Amine hinsichtlich der Einflussfaktoren sehr unterschiedlich. So wird von einer verstärkten Histaminbildung unter den „minimalsten“ Versuchsbedingungen, sprich einem Milieu ohne Malat oder Glucose berichtet. Hierdurch werden die Bakterien gezwungen Aminosäuren (Histidin) zu verstoffwechseln, um an Energie zu kommen [Lonvaud-Funel und Joyeux 1994]. Tyramin hingegen wird vermehrt in „komplexem“ Medium (Glucose) gebildet [Moreno-Arribas, Torlois et al. 2000]. Histamin und Tyramin besitzen somit nicht dieselbe metabolische Rolle. Faktoren, die für die Bildung biogener Amine förderlich sind, sind sehr multipel und hängen in komplexer Weise voneinander ab [Ancin-Azpilicueta, Gonzalez-Marco et al. 2008].



**Abbildung 3: Aminosäuren und die korrespondierenden biogenen Amine nach Decarboxylierung zusammen mit den entsprechenden Decarboxylasen (HDC = Histidin-Decarboxylase; DDC = Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase/DOPA-Decarboxylase; ODC = Ornithin-Decarboxylase; ADC = Arginin-Decarboxylase; LDC = Lysin-Decarboxylase; SDC = Serin-Decarboxylase; TDC = Tyrosin-Decarboxylase).**

Abbildung 3 zeigt als Übersicht die als Präkursoren fungierenden Aminosäuren, die wie beschrieben durch substratspezifische Decarboxylasen in die korrespondierenden biogenen Amine umgewandelt werden.

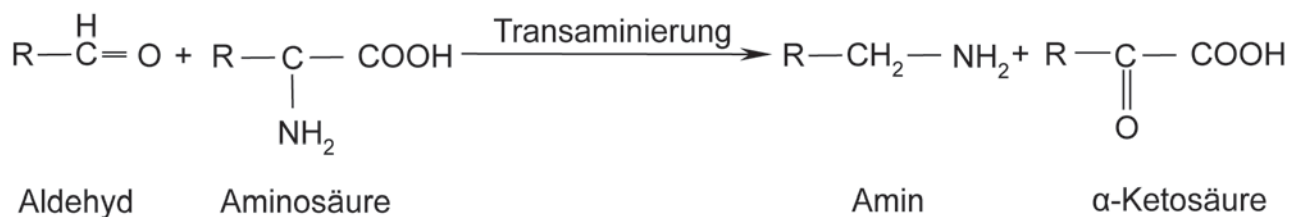
Weitere Bildungswege sind die aufgeführte Aminierung von Aldehyden und Ketonen sowie der meist „unspezifische“ Abbau stickstoffhaltiger Verbindungen wie Lipide



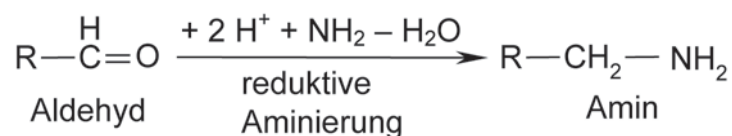
oder Eiweiße [Eder, Brandes et al. 2001] wodurch vor allem Methyl-, Ethyl-, Dimethyl- und Ethanolamin gebildet werden.

Aliphatische Diamine (Putrescin, Cadaverin) entstehen auf ähnlichem Weg wie die in Abbildung 1 dargestellte Bildung der biogenen Amine durch Decarboxylierung. Hierbei wird bei der Transaminierung die Aminogruppe von der Aminosäure auf das Pyridoxalphosphat übertragen. In einem ersten Schritt entsteht eine  $\alpha$ -Ketosäure und Pyridoxaminphosphat. Ein Aldehyd (Ethanal, Butanal, Hexanal...) lagert sich an das Pyridoxaminphosphat, wonach das Amin und Pyridoxalphosphat freigesetzt werden (Abbildung 4). Erfolgt die Transaminierung mit einem Keton an Stelle des Aldehydes entstehen sekundäre Amine.

Gleichzeitig besteht die Möglichkeit der reduktiven Aminierung von Aldehyden (Abbildung 5). Beide Bildungswege können zu flüchtigen Aminen wie Methylamin oder Ethylamin führen, die hauptsächlich in der Beere gebildet werden [Ough, Daudt et al. 1981].



**Abbildung 4: Aminbildung aus Aldehyden. Vereinfachte Darstellung der Transaminierung**



**Abbildung 5: Aminbildung aus Aldehyden. Reduktive Aminierung**

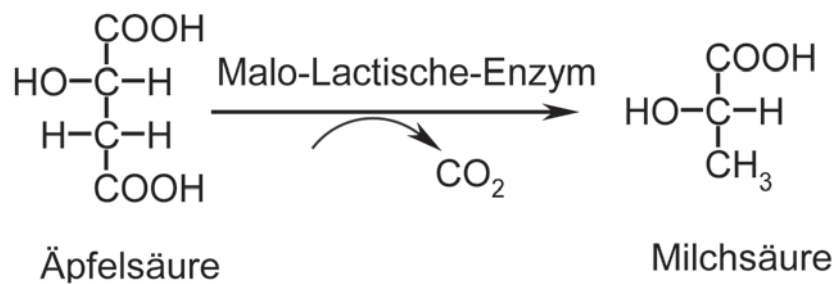
Polyamine wie Spermin, Spermidin aber auch Histamin sind natürlicher Bestandteil lebender Zellen [Silla Santos 1996] und fungieren dort als Stressschutz [Bouchereau, Aziz et al. 1999]. So beruht nach Schiller, Kruse et al. (2000) die physiologische Funktion von Putrescin auf dem Schutz vor osmotischem Stress bei *Escherichia coli* [Schiller, Kruse et al. 2000]. Tkachenko, Nesterova et al. (2001) beschreiben, wie ein Zusatz von Putrescin zu *Escherichia coli* Kulturen unter oxydativem Stress zu einem Anstieg der Überlebensfähigkeit führt [Tkachenko, Nesterova et al. 2001]. Putrescin wird zudem als extrazellulärer Signalstoff eine wichtige Funktion beim swarming



(kollektives Verhalten der Ausbreitung) von *Proteus mirabilis* zugeschrieben [Sturgill und Rather 2004].

## 3.2 Der biologische Säureabbau – biochemische Grundlagen

Ziel des biologischen Säureabbaus (BSA) ist aus biochemischer Sicht die mikrobielle Umwandlung der zweiwertigen Äpfelsäure in die einwertige Milchsäure [Radler 1965; Schütz und Radler 1973]. Ziele aus oenologischer Sicht sind dabei die Säureverringerng durch die Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration, und damit ein Anheben des pH-Wertes. Zudem geht eine sensorische Veränderung der Weine durch die Säureverringerng oder Ausprägung buttriger Noten durch Diacetyl, aber auch positive Intensivierung von dunklen Beerenfrüchten bei Rotweinen [Bartowsky, Costello et al. 2011] einher. Die Weine werden stabiler, indem das Ausgangsprodukt für einen späteren BSA auf der Flasche bereits abgebaut wird. Dies gilt insbesondere für die Rotweinbereitung. Hier kann auf den BSA grundlegend nicht verzichtet werden, da durch die hohe Extraktion während der Maischegärung der pH-Wert angehoben wird und die Gefahr eines Äpfelsäureabbaus auf der Flasche zu hoch ist.

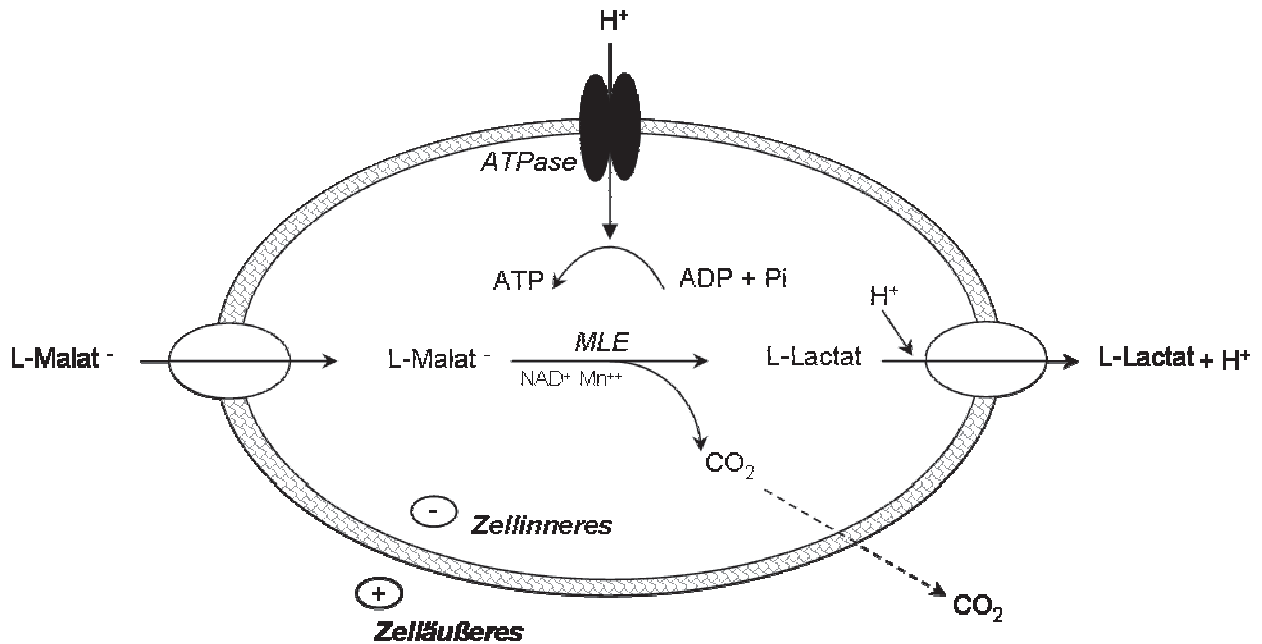


**Abbildung 6: Bakterielle Umwandlung der Äpfelsäure in Milchsäure**

Durch Milchsäurebakterien (MSB) wird dabei von einer Carboxylgruppe der Äpfelsäure  $\text{CO}_2$  abgespalten. Aus einem Mol Äpfelsäure entstehen somit jeweils ein Mol Milchsäure und ein Mol  $\text{CO}_2$ . Hierbei verringert sich die titrierbare Säure um die Hälfte des Äpfelsäureanteils. Das Enzym, das hierfür in den Bakterien verantwortlich ist, ist das sogenannte Malo-Lactische-Enzym (aus dem französischen *acide malique* = Äpfelsäure und *acide lactique* = Milchsäure). Dieses Enzym benötigt  $\text{NAD}^+$  sowie



$Mn^{++}$  als Cofaktoren, wobei aus L-Malat nur L-Lactat entsteht [Lonvaud-Funel und Strasser De Saad 1982]. Bei dieser Decarboxylierungsreaktion entsteht im Vergleich zur Umwandlung der Äpfelsäure durch die Malatenzyme Malatoxidoreduktasen (E.C. 1.1.1.37-.38 oder .39) kein Pyruvat oder Oxalacetat und es erfolgt auch kein Energiegewinn in Form von  $NADH + H^+$  [Schütz und Radler 1973]. Dennoch bedeutet der Äpfelsäureabbau über das Malo-Lactische-Enzym für Bakterien einen Energiegewinn [Cox und Henick-Kling 1989; Bartowsky 2005].



**Abbildung 7: Modell der intrazellulären ATP – Erzeugung bei der Umsetzung von L-Malat zu L-Lactat durch das Malo-Lactische-Enzym (MLE). Verändert nach [Cox und Henick-Kling 1989; Bartowsky 2005; Osborne und Edwards 2005].**

Durch die Decarboxylierung wird Energie gewonnen und durch das Anheben des pH-Wertes werden die Milieubedingungen verbessert. Durch die Aufnahme von Äpfelsäure und dem Ausscheiden von Milchsäure gelingt es den Bakterien Energie via einer membranären *ATPase* in Form von ATP zu konservieren. Bei diesem Vorgang entsteht aus L-Äpfelsäure (L-Malat) L-Milchsäure (L-Lactat). Jedoch nicht nur L-Äpfelsäure kann von Milchsäurebakterien verstoffwechselt werden, sondern neben dem eigentlich erwünschten Abbau des Malats auch eine Reihe anderer Weininhaltsstoffe, die zu mehr oder weniger erwünschten Stoffwechselprodukten führen.

Ein grober Ablauf, wie Weininhaltsstoffe durch MSB abgebaut werden können, ist in Abbildung 8 dargestellt.





**Abbildung 8: Abfolge des Stoffwechsels von ausgewählten Weinhaltstoffen durch Milchsäurebakterien.**

Angelehnt an den Review von Swiegers, Bartowsky et al. (2005) ist der Metabolismus von Zuckern und organischen Säuren während des BSA's in drei Phasen zu unterteilen. In der ersten Phase, der Wachstumsphase, wird von den Bakterien Zucker katabolisiert, wobei geringe Mengen Essigsäure und Lactat entstehen. Während der zweiten Phase und dem Anstieg der Zellpopulation auf  $5 \times 10^6$  cfu/mL kommt der Zuckerkatabolismus zum Erliegen und die Umwandlung der Äpfelsäure zu Milchsäure beginnt. Während der dritten Phase wird die Zitronensäure angegriffen, wodurch ein Anstieg an flüchtiger Säure zu verzeichnen ist. Auch wenn Pan, Jussier et al. (2011) während des biologischen Säureabbaus mit Starterkulturen sogar einen leichten Anstieg an Glucose in der Endphase des BSAs verzeichnen und diesen auf die Hydrolyse glucosidisch gebundener Weinhaltstoffe zurückführen, wird allgemein davon ausgegangen, dass nach dem Abbau der Zitronensäure der verbleibende Hexosengehalt als C-Quelle für die Bakterien dient, was zu einem Anstieg an flüchtiger Säure führen kann [Ribéreau-Gayon, Dubourdiou et al. 2006]. Ergänzt man diese Darstellung durch die Ergebnisse von Terrade und Mira de Orduña (2009), sind als essentielle Nährstoffe für das Wachstum von Milchsäurebakterien neben C- und P- Quellen auch Magnesium, Vitamine (Nikotinsäure, Pantothenensäure) und Aminosäuren, im Speziellen Prolin, Arginin, Valin, Leucin und Isoleucin aufzuführen. Da Aminosäuren auch zu biogenen Aminen decarboxyliert werden können, werden diese sowohl zu Beginn des Wachstums als auch nach dem Äpfelsäureabbau metabolisiert [Terrade und Mira de Orduña 2009]. Arginin wird von den Bakterien verstoffwechselt, da dieser Stoffwechselweg einen Energiegewinn in Form von ATP für die Bakterien bedeutet [Bartowsky 2005], wobei über die Umwandlung von Arginin zu Ornithin Putrescin entstehen kann [Guerrini, Mangani et al. 2002].

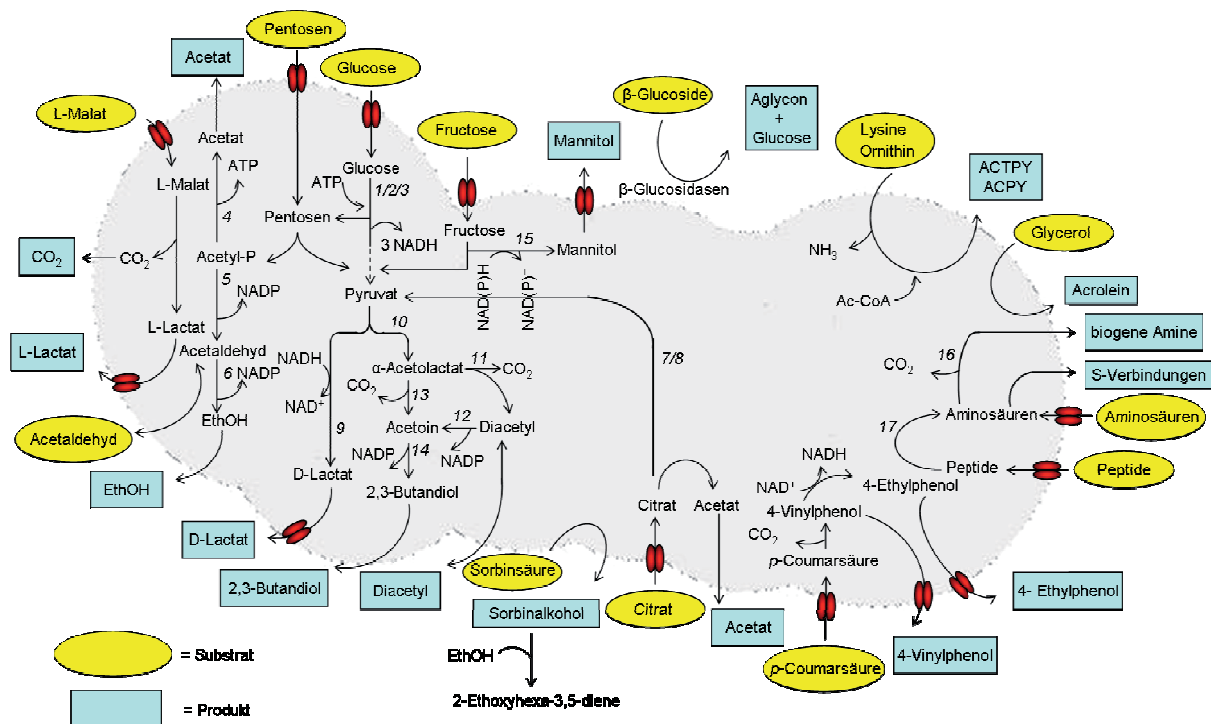
Die entsprechenden Stoffwechselwege unterliegen verschiedenen Bedingungen wie der dominierenden Bakterienart, aber auch den Milieubedingungen.

Homofermentative Bakterien (*Pediococcus*- und einige *Lactobacillus*-Arten) bilden aus Hexosen fast ausschließlich Milchsäure (D- oder L-Lactat in Abhängigkeit vom



Bakterium), wobei aus einem Mol Glucose 2 Mol Lactat entstehen. Heterofermentative Bakterien (*Leuconostoc*, einige *Lactobacillus*-Arten und *Oenococcus oeni*) bilden aus einem Hexosemolekül D-Lactat,  $\text{CO}_2$ , Ethanol und Acetat [Radler 1965]. Im Medium Wein sind aber nur vier Arten (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* und *Pediococcus*) in der Lage, unter den unvorteilhaften Bedingungen (niedriger pH-Wert; Ethanol; Nährstoffmangel,  $\text{SO}_2$ ) zu überleben [Swiegers, Bartowsky et al. 2005]. Nach der größeren Darstellung der Sukzession des Metabolismus relevanter Inhaltsstoffe wird im Folgenden detaillierter auf die Bildung wichtiger Stoffwechselprodukte eingegangen.

In Abbildung 9 ist eine vereinfachte Darstellung der Stoffwechselwege von Milchsäurebakterien, bezogen auf ausgewählte Weinhaltstoffe und deren Umwandlungsprodukte dargestellt.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Stoffwechselwege von Milchsäurebakterien verändert nach [Bauer und Dicks 2004; Swiegers, Bartowsky et al. 2005]. 1, Hexokinase; 2, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase; 3, 6-Phosphogluconat Dehydrogenase; 4, Acetat Kinase; 5, Acetaldehyd Dehydrogenase; 6, Ethanoldehydrogenase; 7, Citrat Lyase; 8, Oxalacetat Decarboxylase; 9, Lactat Dehydrogenase; 10,  $\alpha$ -Acetolactat Synthetase; 11, nicht enzymatische decarboxylierte Oxidation von  $\alpha$ -Acetolactat; 12, Diacetyl Reductase; 13,  $\alpha$ -Acetolactat Decarboxylase; 14, Acetoin Reductase; 15, Mannitol Dehydrogenase; 16, Aminosäuren Decarboxylase; 17, Peptidase.

Relevant sind die Stoffwechselprodukte der im Wein dominierenden heterofermentativen Bakterien (u.A. *Oenococcus oeni*), die im Gegensatz zu



homofermentativen Bakterien (u.a. *Pediokokken*) niedrigere pH-Werte und Alkohol besser vertragen, aber aus Zucker nicht nur Milchsäure, sondern auch die in Abbildung 9 dargestellten Nebenprodukte bilden können. Neben dem bereits beschriebenen BSA werden im Stoffwechsel heterofermentativer MSB Hexosen und Citrat umgewandelt. Sowohl Glucose als auch Fructose werden hierbei in D-Lactat,  $\text{CO}_2$ , Essigsäure (Acetat) und Ethanol umgewandelt. Hierbei wird Acetyl-P entweder zu Ethanol reduziert oder zu Acetat umgewandelt, wenn eine andere Reoxydation des Coenzym NADPH +  $\text{H}^+$  nicht möglich ist. Gleichzeitig wird bei Mangel an Pantothenensäure verstärkt Acetat gebildet, da das Acetyl-P nicht zu Ethanol umgewandelt werden kann. In aerobem Millieu bilden MSB (vor allem *Leuconostoc*-Arten) Lactat und Acetat, in eher reduktivem Millieu Lactat und Ethanol. Hieraus erschließt sich automatisch für die Praxis, die Sauerstoffzufuhr während des BSAs zu reduzieren. Dennoch werden Ethanol und Acetat immer durch heterofermentative Bakterien gebildet. Bei einem induzierten BSA mit selektionierten Milchsäurebakterien der Art *Oenococcus oeni* steigt der Gehalt an flüchtiger Säure durch den Zitronensäuremetabolismus um maximal 0,2 g/L an, insofern möglichst reduktiv während des BSAs gearbeitet wird [Costello 2005].

Neben der Gefahr, dass die flüchtige Säure ansteigt, ist in der Regel auch die Bildung der buttrigen Note des Diacetyls unerwünscht. So besitzen die meisten eingesetzten Starterkulturen eine Citratlyase und somit wird Citrat in den meisten Fällen, wenn auch nicht vollständig, verstoffwechselt [Bartowsky und Henschke 2004]. Neben der Bildung von Diacetyl wird auch in diesem Fall Acetat gebildet. Welches Endprodukt vermehrt gebildet wird, bestimmen in diesem Fall die Millieubedingungen, die einen Einfluss auf das Populationswachstum haben. Bei niedrigem pH-Wert und weiteren wachstumshemmenden Effekten wird mehr Acetoin und Diacetyl gebildet. Hierbei wird das Pyruvat nicht zum Aufbau von Zellmaterial verwendet, die Zelle muss aber ihren intrazellulären pH-Wert halten und somit das Pyruvat eliminieren. Dies geschieht durch die Bildung von Diacetyl und Acetoin, um die Zelle regelrecht zu entgiften. Im Gegensatz dazu wird, wenn optimale Bedingungen für das Populationswachstum der Bakterien vorliegen, das Pyruvat zum Aufbau von Fettsäuren genutzt, aber gleichzeitig auch mehr Acetat gebildet. Dieser Schritt bedeutet für die Bakterien zudem einen Energiegewinn in Form von ATP. Zitronensäure wird während des BSAs immer abgebaut (es sei denn, es werden Citrat negative Stämme eingesetzt). Jedoch führt dies, wie der



Äpfelsäureabbau selbst auch, zu einer mikrobiellen Stabilisierung des Weines für seine Reifung auf der Flasche, da eine weitere Energiequelle abgebaut wird [Bartowsky 2005].

Das entstehende Diacetyl prägt den Wein sensorisch und der Geruch erinnert an Butter. In Bereichen von 2-3 mg/L in Weißwein und etwa 5 mg/L in Rotwein kann sein sensorischer Beitrag sogar als positiv bewertet werden. Unter 4 mg/L soll Diacetyl allgemein zur Komplexität der Weine beitragen [Bartowsky 2009]. Über 5-7 mg/L wird der Geruchseindruck jedoch als negativ beurteilt [Swiegers, Bartowsky et al. 2005]. Der Schwellenwert von Diacetyl ist jedoch stark vom Weintyp abhängig, so wird für Chardonnay ein Gruppenschwellenwert von nur 0,18 mg/L, für Spätburgunder 0,89 mg/L und Cabernet Sauvignon 2,68 mg/L angegeben [Martineau, Acree et al. 1995]. Die sensorische Ausprägung der „Butternote“ lässt sich allerdings beeinflussen. Hierbei spricht man vom sogenannten Diacetylmanagement. Hierbei bietet sich die Möglichkeit die Butternote sprichwörtlich durch Reduktion in ihrer sensorischen Ausprägung zu reduzieren.

Das entstandene Diacetyl kann in zwei Schritten reduziert werden, wobei jeweils ein  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , also Redoxpotential, verbraucht und oxydiert wird. Dies geschieht durch das Enzym Diacetylreduktase, das sowohl in Hefen als auch Bakterien vorhanden ist. Zunächst wird Diacetyl zu Acetoin und dann weiter zu 2,3-Butandiol reduziert, welche selbst nicht mehr nach Butter riechen. Einen umfassenden Überblick über die möglichen Metabolite, die beim BSA entstehen können bieten die Reviews von Liu (2002), Osborne und Edwards (2005), Bartowsky (2005) sowie Swiegers, Bartowsky et al. (2005).

Nach Liu (2002) ist die Co-Fermentierung von Citrat und Glucose wichtig für die Bakterien, da die Wachstumsrate und somit ein Anstieg der Biomasse gefördert wird. Dies wird durch einen Anstieg der ATP – Synthese auf Substratlevel (Phosphorylierung über die Acetatkinase) und durch den chemiosmotischen Mechanismus (proton motive force) erzielt. Pentosen werden von heterofermentativen Milchsäurebakterien über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt, wodurch aus einem Mol Pentose ein Mol Lactat und Acetat sowie zwei Mol ATP gebildet werden. Fructose kann zu Mannitol reduziert werden, wobei meist gleichzeitig mehr D- Lactat und Essigsäure gebildet werden [Liu 2002; Bartowsky 2009]. Neben den aromabeeinflussenden Stoffen Essigsäure und Diacetyl können von verschiedenen *Lactobacillen* und *Pediococcen* aus Ferulasäure und *p* –



Coumarsäure auch die nach Pferdeschweiss, Leder und medizinisch riechenden flüchtigen Phenole 4-Vinylphenol und 4-Ethylphenol bzw. -Guaiacol gebildet werden [Liu 2002]. Nach Swiegers, Bartowsky et al. (2005) bleibt jedoch unklar, inwieweit Bakterien überhaupt flüchtige Phenole im Wein bilden können, da Phenolcarbonsäuren einen inhibierenden Effekt auf das Populationswachstum von Bakterien haben können [Bartowsky 2009; Campos, Figueiredo et al. 2009]. Die Bildung dieser Substanzen wird maßgeblich *Brettanomyces bruxellensis* zugeschrieben, wobei auch hier der typische sensorische „Brett-Charakter“ durch Isobuttersäure und Isovaleriansäure maskiert werden kann [Romano, Perello et al. 2009]. Eine Möglichkeit im Rotwein den finalen Gehalt an flüchtigen Phenolen zu steuern ist nach Benito, Palomero et al. (2009) der Einsatz von *Saccharomyces* mit hoher Aktivität von Hydroxycinnamoyl-CoA-Lyase, da die so gebildeten Vinylphenole an Anthocyane gebunden werden, um stabile Pyranoanthocyane zu bilden [Benito, Palomero et al. 2009]. Als weiterer Weinefehler ist der durch heterofermentative Milchsäurebakterien gebildete Mäuselton zu nennen. Die dafür verantwortlichen Substanzen sind 2-Acetyltetrahydropyridin (ACTPY), 2-Acetyl-1-pyrrolin (ACPY) und 2-Ethyltetrahydropyridin (ETPY). Diese Substanzen können aus dem Stoffwechsel der Aminosäuren Lysin und Ornithin gebildet werden. Es sind jedoch nur heterofermentative Milchsäurebakterien in der Lage diese Fehltonen zu bilden [Swiegers, Bartowsky et al. 2005; Bartowsky 2009]. Bei Arbeiten mit *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176 konnte gezeigt werden, dass die für den Mäuselton verantwortlichen Substanzen nur gebildet werden können, wenn neben den zwei Aminosäuren auch Ethanol, eine Kohlenstoffquelle (D-Fruktose) und  $Fe^{2+}$  vorhanden sind [Costello und Henschke 2002]. Neben Bakterien kann der Mäuselton auch durch *Brettanomyces bruxellensis* gebildet werden [Oelofse, Lonvaud-Funel et al. 2009].

Arginin kann als mengenmäßig bedeutendste Aminosäure im Wein über den Arginindeiminaseweg (ADI) zu Citrullin umgewandelt werden [Liu 2002]. Citrullin wiederum kann als Präkursor für die Bildung von Ethylcarbamat fungieren, wobei für *Lactobacillus hilgardii* X1B die Ethylcarbamatbildung aus dem Argininmetabolismus nachgewiesen wurde [Arena und Manca De Nadra 2005].

Wird Sorbinsäure bei der Weinbereitung eingesetzt, um diesen gegen ein Nachgären zu stabilisieren, kann von *Oenococcus*, *Lactobacillen* und *Pediococcus* in Verbindung mit Ethanol 2-Ethoxy-3,5-hexadien gebildet werden, eine Substanz,



welche einen Geruch gequetschter Geranienblätter hat [Chisholm und Samuels 1992; Bartowsky 2009]. Neben den negativ geruchlich wahrnehmbaren Aromaveränderungen kann aus dem Glycerinstoffwechsel von *Pediokokken* aber auch *Lactobacillen* Acrolein gebildet werden, welches in Kombination mit phenolischen Weinhaltstoffen zu einem Anstieg der Bitterwahrnehmung führt [Rentschler und Tanner 1951; Drawert 1970; Osborne und Edwards 2005; Bartowsky 2009].

Acetaldehyd als bedeutendes Stoffwechselprodukt der alkoholischen Gärung hat nicht nur wichtige sensorische Eigenschaften (Apfel-nussiges Aroma), sondern ist der Hauptbindungspartner für  $\text{SO}_2$  und spielt eine wichtige Rolle bei der Farbstabilisierung von Rotweinen [Timberlake und Bridle 1976; Swiegers, Bartowsky et al. 2005]. Manche *Oenococcus oeni* Stämme als auch manche *Lactobacillen* sind in der Lage, Acetaldehyd zu Essigsäure und Ethanol zu metabolisieren [Osborne, Mira de Orduña et al. 2000]. Der Abbau von Acetaldehyd hängt direkt mit dem Abbau von Malat zusammen, wobei etwa 90 % des Acetaldehydes während der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien abgebaut wird. Bei höherem pH-Wert (3,6) verläuft der Abbau beider Substanzen schneller als bei niedrigem pH (3,3). Wichtiger Einflussfaktor spielt dabei aber auch das an Acetaldehyd gebundene  $\text{SO}_2$ . Das so gebundene  $\text{SO}_2$  verzögert den Malatabbau signifikant und kann bei pH 3,3 eine Verzögerung von bis zu 33 Tagen zur Folge haben, doch nicht nur der Abbau der Äpfelsäure wird verzögert, es kann sogar zu einem erneuten Anstieg an Acetaldehyd kommen, der weit über den Ausgangsgehalten nach der alkoholischen Gärung liegen kann [Osborne, Dubé Morneau et al. 2006]. Dies kann nach den Autoren auf die chemische Oxydation von Ethanol zu Acetaldehyd während der Probenahme zurückgeführt werden.

Der biologische Säureabbau kann neben dem Abbau von Acetaldehyd durchaus zu einer weiteren positiven Aromaveränderung führen. So berichten sowohl Maicas, Gil et al. (1999) als auch Pozo-Bayón, G-Alegria et al. (2005) von einer Zunahme an höheren Alkoholen wie 1-Propanol, Isobutanol oder diversen Estern [Maicas, Gil et al. 1999; Pozo-Bayon, G-Alegria et al. 2005]. Zudem wird in der Literatur die Glucosidaseaktivität unterschiedlicher *Oenococcus oeni*-Stämme diskutiert, wobei der eindeutige Beitrag der Milchsäurebakterien auf die Freisetzung glucosidisch gebundener Aromstoffe noch weitgehend ungeklärt ist. Dasselbe gilt für die Verstoffwechslung schwefelhaltiger Aminosäuren oder Peptide wie Cystein oder

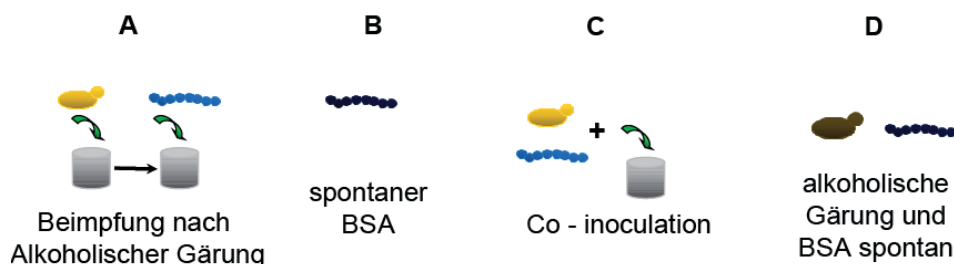




Glutathion, wobei die Bildung wichtiger Aromen durch die Reaktion mit Diacetyl diskutiert wird [Swiegers, Bartowsky et al. 2005].

Neben den beschriebenen Stoffwechselprodukten soll an dieser Stelle aus Sicht der Nahrungsmittelverträglichkeit und dem Schwerpunkt der Arbeit noch einmal kurz auf die in Kapitel 3.1 beschriebene Bildung biogener Amine hingewiesen werden. Diese werden hauptsächlich von MSB durch Decarboxylierung von Aminosäuren gebildet. *Lactobacillen*, *Pediococcen* aber auch *Oenococcen* sind in der Lage biogene Amine zu bilden, wobei *Oenococcen* hauptsächlich Histamin und *Lactobacillen* hauptsächlich Tyramin bilden [Moreno-Arribas, Torlois et al. 2000]. Für *Leuconostoc oenos* 9204 (*Oenococcus oeni*) wurde die Histidindecarboxylase beschrieben [Rollan, Coton et al. 1995; Coton, Rollan et al. 1998], kurze Zeit später bei *Lactobaccillus brevis* IOEB 9809 die Tyrosindecarboxylase [Moreno-Arribas und Lonvaud-Funel 1999; Moreno-Arribas, Torlois et al. 2000].

Bei der Weinbereitung ergeben sich grob unterteilt vier Möglichkeiten den BSA durchzuführen, die mehr oder weniger durch den Winzer gesteuert ablaufen können.



**Abbildung 10: Möglichkeiten der gesteuerten und ungesteuerten Durchführung des BSA**

In Abbildung 10 sind diese Varianten dargestellt. Bei den Varianten A und C unterscheidet sich der Beimpfungszeitpunkt. Bei A wird nach der alkoholischen Gärung beimpft, wohingegen in Variante C 24 Stunden nach der Hefezugabe Milchsäurebakterien zugegeben werden. Bei den Varianten B und D verläuft der BSA spontan, wobei in Variante B mit Reinzuchthefen gearbeitet wird. Bedingt durch die Gefahr, dass Bakterien Hexosen unter Bildung von Essigsäure verstoffwechseln, wird bei einem Einsatz von Starterkulturen in der Regel Variante A durchgeführt. Viel zitiert wird hierbei Lonvaud-Funel (1999) [Pan, Jussier et al. 2011], die eindeutig auf der Gefahr der Bildung flüchtiger Säure bei der Co-inoculation hinweist. Dennoch wurden schon früh positive Erfahrungen mit der Co-inoculation gemacht. Der Erfolg des ungestaffelten Einsatzes von Reinzuchthefen und BSA-Starterkulturen hängt jedoch dabei stark von der Kompatibilität zwischen Hefen und Bakterien ab. Wird auf



eine Mostschwefelung verzichtet und mit Hefen gearbeitet, die nur geringe Mengen an  $\text{SO}_2$  bilden, so spricht nach Henick-Kling und Park (1994) nichts gegen diese Form des gesteuerten biologischen Säureabbaus [Henick-Kling und Park 1994]. Nach Pan, Jussier et al. (2011) ist der Malatabbau bei der Co-inoculation schneller als bei einer Beimpfung nach Ende der alkoholischen Gärung, wobei bei hohen pH-Werten der Trend zu mehr flüchtiger Säure durch die Co-inoculation geht. Die von Henick-Kling und Park (1994) beschriebene Anforderung an das Zusammenwirken zwischen Hefen und Bakterien ist von Alexandre, Costello et al. (2004) in einem umfassenden Review aufgearbeitet. So kann die Interaktion zwischen Hefen und Bakterien, bezogen auf *Saccharomyces cerevisiae* und *Oenococcus oeni*, von gegenseitiger Hemmung, neutralem Verhalten bis zu stimulierend reichen. Die Ethanolbildung durch Hefen kann das Wachstum der Bakterienpopulation hemmen, während Malat dennoch abgebaut werden kann. Wie von Henick-Kling und Park (1994) wird auch hier auf die hemmende Wirkung der  $\text{SO}_2$ , sei es durch die Maischeschwefelung oder durch Hefen gebildet, hingewiesen. Als hemmend für die Bakterien wirken auch mittelkettige Fettsäuren. So können 30 mg/L Decansäure für Bakterien toxisch sein und den BSA komplett verhindern. Undissoziierte Fettsäuren können zwar zunächst aktivierend wirken, wenn sie aber in der Bakterienzelle deprotoniert werden, führt dies zu einer intrazellulären Ansäuerung. Niedrige pH-Werte und hohe Alkoholgehalte verstärken diese Wirkung. Weitere Stoffwechselprodukte von Hefen wiederum können den Bakterien helfen, die Lagphase schneller zu überwinden. Hierzu zählen Hefeautolyseprodukte wie Zellwandpolysaccharide und Proteine. Mannoproteine sind zudem in der Lage, gebildete hemmende Fettsäuren zu absorbieren oder aktivieren gezielt in Konzentrationen von 200 mg/L das Wachstum von Milchsäurebakterien [Diez, Guadalupe et al. 2010]. Umgekehrt ist bekannt, dass die hohen Mengen an flüchtiger Säure, durch *Lactobacillus kunkeei* gebildet, die Hefen hemmen und zu einem frühen Zelltod führen. Auch extrazelluläre bakterielle  $\beta$ -1,3-Glucanase kann Hefezellwände lysieren und somit hemmend auf die alkoholische Gärung wirken [Alexandre, Costello et al. 2004].

Varianten B und D der Abbildung 10 bergen ein hohes Risiko, was die Weinqualität und auch Verkehrsfähigkeit der Weine anbetrifft. Osborn und Edwards (2005) beschreiben sehr deutlich die Sukzession der Mikroorganismenflora während der alkoholischen Gärung als auch des biologischen Säureabbaus. Zunächst dominieren





nicht-*Saccharomyceten* das Medium, sie werden jedoch bald von den dann dominierenden *Saccharomyceten*, besser an Sauerstoffmangel und steigende Alkoholgehalte angepasst, abgelöst. Während der Absterbephase der Hefen steigt die Populationsdichte von *Oenococcus oeni* an, die wiederum nach beendetem Malatabbau pH-abhängig von *Lactobacillen* und *Pediokokken* abgelöst werden können. Unter den *Oenokokken*, die den spontanen BSA dominieren, herrscht wiederum eine große genotypische Vielfalt [Lopez, Tenorio et al. 2007]. Die Gefahr, dass eine Vielzahl sowohl hefen- als auch bakteriell induzierte Weinfehler auftreten können, ist groß.

In welcher Form auch immer der BSA erfolgt, bleibt seine gewollte oder ungewollte Durchführung auf Grund der komplexen Zusammenhänge eine Herausforderung für den Winzer. Hinzu kommt, dass die Ernte reiferer Trauben, die Erzeugung von Weinen mit geringerer Säure sowie die erhöhte Rotweinproduktion zu steigenden pH-Werten führen, welche eine Vermehrung von Schadorganismen begünstigen. Die Wirkung von  $\text{SO}_2$ , welches in der Praxis zur Stabilisierung der Mikroflora eingesetzt wird, nimmt ebenfalls bei höheren pH-Werten ab. Somit ergeben sich in Zukunft neue Herausforderungen, um den biologischen Säureabbau und die Aktivität der Mikroorganismen in gewünschtem Maße zu steuern. Ein mögliches Szenario um in die Gärprozesse im Zuge der Weinbereitung regulativ einzugreifen, ist in Abbildung 11 aufgeführt, wobei es sich hierbei um eine sehr optimierte Version handelt.

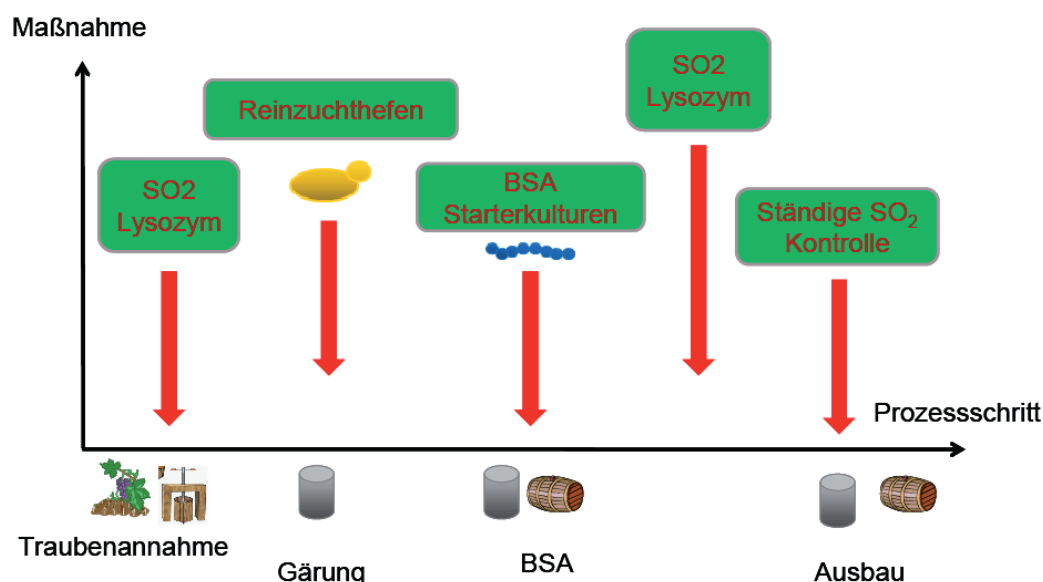


Abbildung 11: Mögliche Maßnahmen, um im Zuge der Weinbereitung Gärprozesse möglichst optimiert zu steuern.

Neben dem Einsatz von Starterkulturen bietet der kombinierte Einsatz von Lysozym und  $\text{SO}_2$  zum heutigen Stand des Einsatzes oenologischer Stabilisierungsprodukte

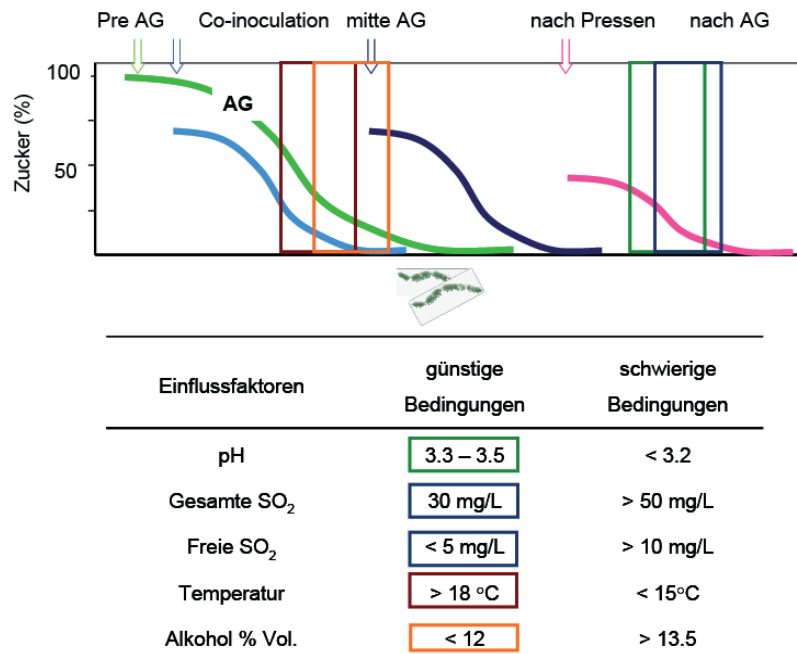


maximalste Prozesskontrolle. Der Einsatz von Lysozym ist seit 2001 in der EU zugelassen (maximale Konzentration 500 mg/L Wein). Lysozym (E.C. 3.2.1.17) ist eine Muramidase aus Hühnereiweiß, welche eine lytische Wirkung auf die Zellwände von Gram-positiv Bakterien aufweist. Seine lytische Wirksamkeit basiert auf der Hydrolyse der  $\beta$ -1,4 Bindung zwischen der N-Acetylmuraminsäure und den 2-Acetamido-2-desoxyglucoseresten der Zellwand. Hierdurch ist jedoch keine vollständige Hemmung der Mikroorganismen gegeben, da die niedrigen pH-Werte sowie die hohen Ethanolkonzentrationen die Wirkung dieses Enzyms herabsetzen [Eggert, Rawel et al. 2006]. Ebenfalls ist Lysozym nicht in der Lage, bestimmte Bakterien mit modifizierten Zellwänden in ihrem Wachstum zu hemmen. Die Aktivität von Lysozym gegenüber der Peptidoglycanstruktur (Murein-Sacculus) von Gram + Bakterien hängt zudem vom physiologischen Stadium der Bakterien ab [Vollmer, Blanot et al. 2008]. Gerbaux, Villa et al. (1997) stellen fest, dass die Wirkung von Lysozym weniger konzentrations- sondern eher weintypabhängig ist. Sowohl bei Pinot Noir als auch Chardonnay konnte selbst mit Konzentrationen von 125 mg/L das Wachstum von *Oenococcus oeni* unterbunden werden. Im Gegensatz zu Eggert, Rawel et al. (2006) zeigte sich in diesen Versuchen, dass die Wirksamkeit von Lysozym bei niedrigen Säurewerten effektiver war. Insgesamt kann eine positive Bilanz gezogen werden. Sowohl mit Lysozym (500 mg/L) als auch SO<sub>2</sub> (40 mg/L) konnte der Gehalt an flüchtiger Säure im Vergleich zur Kontrolle (ohne Zusätze) um 43 % gesenkt werden. Bei Pinot Noir stieg der Gehalt an Histamin, Tyramin und Putrescin ohne Lysozym um mehr als 75 % an. Bei Chardonnay stieg nur der Tyramingehalt. Im Vergleich zum Einsatz von SO<sub>2</sub> wirkt sich der Einsatz von Lysozym nicht negativ auf die Farbintensität von Spätburgunder aus. Selbst eine Zugabe von 500 mg/L Lysozym führte zu keiner Abnahme der Farbintensität, wohingegen die Zugabe von 50 mg/L SO<sub>2</sub> einen Farbintensitätsverlust von 22 % zur Folge hatte [Gerbaux, Villa et al. 1997]. Ebenso positive Erfahrungen mit dem Einsatz von Lysozym äußert Bartowsky (2009) wonach *Lactobacillen* inhibiert werden können, der BSA herausgezögert werden kann und das Aroma durch den Lysozymeinsatz nicht negativ verändert wird. Vergleicht man Lysozym mit SO<sub>2</sub> hinsichtlich der Aromenausprägung, so führt eine SO<sub>2</sub>-Gabe zu drei bis fünf mal höheren Acetaldehydgehalten, zudem kann der Lysozymeinsatz zur Bildung höherer Konzentrationen an höheren Alkoholen führen [Sonni, Bastante et al. 2008]. Dennoch kann der Einsatz von Lysozym keine Garantie für eine vollständige



Kontrolle des biologischen Säureabbaus sein. So wirkt Lysozym sicherlich gegen *Oenococcus oeni* aber selbst der Einsatz von 500 mg/L wirkt kaum gegen *Pediococccen* oder *Lactobacillen*, zudem kann ein nicht zu unterschätzender Anteil an Lysozym (speziell bei der Maischegärung von Rotweinen) an Trubstoffe des Mostes gebunden sein und somit unwirksam werden [Delfini, Cersosimo et al. 2004]. Alternativen wie der Einsatz von Bacteriocinen wie Nisin, Pediocin und Plantarcin führen wie Lysozym zur Lyse von Bakterienzellwänden, wobei der Nachweis eines erfolgreichen Einsatzes bei der Weinbereitung noch aussteht [Bartowsky 2009]. Die Entwicklung eines neuen lytischen Enzymcocktails aus *Streptomyces* sp. B578 erscheint sehr vielversprechend, da diese Exoenzyme nahezu alle Milchsäurebakterien aber auch Essigsäurebakterien lysieren [Blättel, Wirth et al. 2009]. Neben dem Einsatz lytischer Enzyme oder SO<sub>2</sub> besteht die Möglichkeit der mikrobiologischen Stabilisierung mittels Dimethyldicarbonat (Velcorin®), welches sich in der Weinwirtschaft bisher kaum durchsetzen konnte, unter anderem auf Grund der Bildung des unerwünschten Zerfallproduktes Methanol und der begrenzten Wirksamkeit [Bauer und Dicks 2004]. Unabhängig der aufgeführten Maßnahmen zu Kontrolle der bakteriellen Flora sind grundlegende Faktoren für die Durchführung des biologischen Säureabbaus zu beachten. Diese stehen wiederum in Zusammenhang mit dem Einsatzzeitpunkt der BSA-Starterkulturen.

In Abbildung 12 sind die wichtigsten Stellgrößen aufgeführt, die der Literatur nach als determinierende Faktoren gelten und entweder günstige Bedingungen oder schwierige Bedingungen für Milchsäurebakterien vorgeben.



**Abbildung 12: Einflussfaktoren auf den biologischen Säureabbau und ihre Auswirkungen**

Grundlegende Faktoren, die zu schwierigen Bedingungen für den BSA führen, sind hohe Säuregehalte und ein niedriger pH-Wert, hohe Alkoholgehalte, hohe SO<sub>2</sub> Konzentrationen, relativ niedrige Temperaturen aber auch kurzkettige Fettsäuren, die von Hefen während der alkoholischen Gärung gebildet werden können [Pan, Jussier et al. 2011]. Genauere Werte werden von Bartowsky (2009) gegeben. So erschweren Alkoholgehalte > 16 % vol., ein pH < 2,9 sowie Temperaturen unter 15°C die bakterielle Aktivität. Die Co – inoculation (in der Regel werden die Bakterienstarterkulturen 24 Stunden nach Zugabe des Hefeansatzes zugegeben) profitiert hierbei vor allem vom niedrigen Alkoholgehalt. Ein zu niedriger pH-Wert kann unabhängig von der BSA-Modalität simultan oder konsekutiv (pH<3,2 und pH<3,35 respektive) zu einem unvollständigen Äpfelsäureabbau führen [Pan, Jussier et al. 2011]. Die Befürchtung, dass durch heterofementative Bakterien aus Glucose und Fructose bei der Co-inoculation signifikant mehr flüchtige Säure gebildet wird, konnte von denselben Autoren nicht bestätigt werden. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass es sich in der Regel bei den eingesetzten BSA-Starterkulturen um *Oenococcus oeni* handelt, die Gattung, die auch mit pH-Werten unter 3,5 zurechtkommt [Davis, Wibowo et al. 1986]. Abhängig davon, ob es sich um die Vergärung von Weißwein oder Rotwein mit Maischegärung handelt, profitiert die frühe Bakterienzugabe nicht nur von geringeren Alkoholgehalten sondern auch von Temperaturen über 15 °C. Bei Weißweinen wird während der alkoholischen Gärung gekühlt vergoren, wodurch der Bakterieneinsatz in der Mitte der Gärung schwierige Bedingungen vorfindet. Durch die in der Regel durchgeführte Maischeschwefelung



sind die Bedingungen hinsichtlich der freien  $\text{SO}_2$  nach dem Pressen oder nach der alkoholischen Gärung günstiger, wobei aber auch, wie schon beschrieben, das an Acetaldehyd gebundene  $\text{SO}_2$  inhibierend wirken kann. Durch den während der Gärung ausfallenden Weinstein erhöht sich der pH-Wert, wodurch nach der Gärung bezüglich dieses Einflussfaktors bessere Bedingungen für den BSA vorliegen. Die Gefahr bei pH-Werten  $> 3,5$  ist aber, dass sich ohne zeitnahe Stabilisierung nach dem Äpfelsäureabbau *Pediococcus parvulus* und Bakterien der Gattung *Lactobacillus* entwickeln, beide bekannt für ihr Potential Weinfehler zu bilden. Ein hoher pH-Wert, verbunden mit einem Gehalt an  $72 \text{ mg/L}$  gesamter  $\text{SO}_2$  sind Garant, dass der BSA durch *Pediococcus parvulus* durchgeführt wird [Davis, Wibowo et al. 1986]. Auf Grund der multiplen Einflussfaktoren, die es beim biologischen Säureabbau zu beachten und steuern gilt, (zudem weinstil- und jahrgangsbedingt eine nicht-chemische Entsäuerung angestrebt wird) beschäftigt sich die Forschung auch mit Alternativen zum Äpfelsäureabbau durch Milchsäurebakterien. So wurde der Einsatz von Hefen mit sehr hoher Zelldichte von mehr als  $10^{10} \text{ cfu/mL}$  leider erfolglos aufgegeben, nur *Schizosaccharomyces pombe* konnte 95-99 % Malat zu Ethanol umwandeln [Gao und Fleet 1995]. Den Ansatz mittels Hefen den Malatabbau zu erzielen, verfolgen auch Husnik, Volschenk et al. (2006). Eine genetisch veränderte Hefe („malolactic yeast strain ML01“), die mit der Malatpermease aus *Schizosaccharomyces pombe* und dem Gen, welches das Malo-Lacto-Enzym kodiert, von *Oenoccus oeni* ausgestattet ist, decarboxylierte  $5,5 \text{ g/L}$  Malat während der alkoholischen Gärung von Chardonnay [Husnik, Volschenk et al. 2006]. Auf Grund der genetischen Veränderung (GMO) wird diese Hefe in Europa sicherlich keine Marktchance haben.

### **3.3 Physiologische Wirkung biogener Amine auf den menschlichen Organismus und ihr Vorkommen in anderen Nahrungsmitteln**

In der Literatur wird die Wirkung von biogenen Aminen auf den menschlichen Organismus sehr kontrovers diskutiert. Klar ist, dass biogene Amine niedermolekulare Verbindungen sind, die eine Vielfalt von physiologischen Wirkungen besitzen. Im normalen Stoffwechsel von Tier, Pflanze und Mikroorganismen werden sie gebildet sowie metabolisiert und stehen in Beziehung zu den Nukleinsäuren, dem Proteinstoffwechsel, zum Nervensystem, sind Vorstufen von Hormonen und Alkaloiden sowie Bausteine von Coenzymen [Pfannhauser und



Pechanek 1984]. So spielen sie als Gewebshormone und Neurotransmitter auch beim Menschen eine bedeutende Rolle für verschiedene Regulationsmechanismen des Organismus (Nervensystem, Herz-Kreislaufsystem, Verdauung und Stoffwechselfvorgänge) [Steneberger 2007].

Histamin ist verantwortlich für die Magensaftsekretion, die Konzentration der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes, der Bronchien und Gefäße sowie der Gebärmutter. Es ist ein wichtiger Entzündungsstoff und Mediator bei allergischen Erkrankungen und spielt im Zentralnervensystem als Neurotransmitter eine große Rolle [Bobak 2010]. Die Intensität der physiologischen Wirkung ist abhängig von der Menge des freigesetzten oder mit der Nahrung aufgenommenen Histamins. So wird bei erhöhten Mengen von negativen Wirkungen wie vermehrter Magensaftproduktion (Sodbrennen), verstärkter Darmperistaltik (Blähungen, Durchfall), Kopfschmerzen, Hautrötungen, Asthma und Kreislaufproblemen berichtet [Pfannhauser und Pechanek 1984; Shalaby 1996; Bobak 2010]. Cadaverin, Putrescin und Histamin wirken blutdrucksenkend. Am stärksten wirkt Histamin, das bei Gesunden einen Kreislauf-Kollaps hervorrufen kann [Noack 1996]. Neben seiner Wirkung auf das Kreislaufsystem besitzt Histamin ein breites Wirkungsspektrum. Es kann bei einer Aufnahme von 10 - 50 mg bei gesunden Menschen pseudoallergische Reaktionen wie Juckreiz, Hitzegefühl und Hypersalivation auslösen. Eine höhere Histamingestion (100 - 1000 mg) kann zu Schwindelgefühl, Benommenheit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Migräne-Anfällen führen [Dunkelberg, Gebel et al. 2006]. Personen mit Störung des Histaminabbaus können bereits bei niedrigeren Dosen entsprechende Vergiftungssymptome zeigen. Intravenöse Histaminverabreichung führt zu Gesichtsrötung und Herzrasen, wobei sehr hohe Mengen an Histamin auch zu Blutdruckabfall (Hypotonie) durch Abnahme der peripheren Arterienresistenz führen. Kopfschmerzen sind die Folge der Hypotonie, wenn der Puls in den cerebralen Arterien wieder ansteigt [Beall 1967]. Nach Jarisch und Wantke (1996) ist histamininduziertes Kopfweg ein vasculäres Kopfweg, welches durch Stickstoffmonoxid hervorgerufen wird [Jarisch und Wantke 1996]. Die häufigsten Lebensmittelvergiftungen stehen in Zusammenhang mit erhöhter Histaminaufnahme, auch als „Scrombriod fish poisoning“ bezeichnet. Die Symptome dieser Fischvergiftung, hervorgerufen durch verdorbenen Thunfisch, Markrelen oder Sardinen, sind Übelkeit, Hautrötung und Kopf- sowie Magenschmerzen [Pfannhauser und Pechanek 1984; Halász, Baráth et al. 1994]. Neben diesen durch Nahrungsmittel





verursachten Reaktionen bestehen außerdem noch einige weitere „pseudoallergene“ Wirkungen des Histamins (hierbei handelt es sich um keine echten allergische Reaktionen, da diese nicht IgE-vermittelt sind; IgE-Antikörper sind spezielle Proteine, mit denen das Immunsystem körperfremde Erreger abwehrt). Symptome einer solchen Histamin-Intolleranz (HIT) sind häufige Kopfschmerzen bis Migräne, verstopfte oder rinnende Nase, Atemwegsbeschwerden bis zum Asthma bronchiale, Herzrhythmusstörungen, chronisch niedriger Blutdruck, Müdigkeit und Erschöpfung, Magen- und Darmbeschwerden, die zu weichem Stuhl oder Durchfall führen können, Juckreiz und Quaddelbildung der Haut [Crnoglavac 2004]. Neben zu hohen Histamin-Werten (Histadelie), können ebenfalls niedrige Histamin-Werte (Histapenie) Beschwerden auslösen. Während die Histadelie mit abnormalen Ängsten, häufigen Tränenausbrüchen, suizidaler Depression und Verwirrtheit in Verbindung gebracht wird führt die Histapenie zu Schizophrenie inklusive Paranoia und Halluzinationen [Pfeiffer 1972; Steneberger 2007].

Histamin ist hinsichtlich seines Wirkungsspektrums auf den menschlichen Körper ausführlich beschrieben, dennoch kann weiteren biogenen Aminen ebenfalls ein grosser Einfluss auf den Organismus zugeschrieben werden. So wird die Lebensmittelvergiftung durch Aufnahme von Tyramin bei Käsekonsum als „cheese reaction“ bezeichnet. In gereiftem Cheddar konnten bis zu 1500 mg/kg Tyramin nachgewiesen werden [Halász, Baráth et al. 1994]. Nach Santos wird in solchen Käsesorten Tyramin durch *Echerichia coli* und *Enterococcus faecals* gebildet [Santos 1995]. Tyramin wirkt wie auch Tryptamin, Serotonin, Phenylethylamin und Dopamin blutdruckerhöhend. Am stärksten wirkt Tyramin. Es kann Blutdruckkrisen hervorrufen, denn bereits eine orale Verabreichung von 6 mg Tyramin kann den Blutdruck auf 150 mm Hg steigern [Noack 1996]. Tyramin steigert den Blutdruck durch Freisetzung von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenenden. Wenn Tyramin nicht abgebaut werden kann, kommt es zudem zu einer Ausschüttung von Serotonin, welches wiederum Migräneanfälle auslösen kann [Pfannhauser und Pechanek 1984]. Auch Phenylethylamin fördert eine Freisetzung von Noradrenalin, was zur Erhöhung des Blutdrucks führt; wobei Tyramin diesbezüglich ca. 10 -fach potenter wirkt [Lüthy und Schlatter 1983].

Über die Nahrung können unterschiedliche biogene Amine aufgenommen werden, die als natürlicher Bestandteil in den Lebensmitteln vorkommen oder durch mikrobiellen Verderb entstanden sind. So sind Polyamine bekannterweise wichtige



Bestandteile lebender Zellen, sie steuern die Nucleinsäurefunktion und Proteinsynthese und spielen eine bedeutende Rolle bei der Stabilisierung von Zellmembranen. Weiterhin haben sie wichtige Funktionen der Signalübertragung und sind bei jedem Schritt der DNA-, RNA-, oder Proteinsynthese essentiell für Wachstum und Zellteilung [Santos 1995]. Im Prinzip weist jedes Nahrungsmittel, welches Proteine enthält, das Potential für die Bildung biogener Amine durch proteolytische Aktivität und die Freisetzung von Aminosäuren, welche zu biogenen Aminen umgewandelt werden, auf [Ten Brink, Damink et al. 1990]. So sind biogene Amine in einer Vielzahl, hauptsächlich fermentierter, Lebensmitteln nachzuweisen. Hierzu zählen Käse, Hefextrakte, Fleischprodukte wie Salami, Fisch, Sauerkraut, Zitrusfrüchte, Spinatblätter, Kakaobohnen aber auch alkoholische Getränke wie Wein, Bier oder Cidre [Smith 1981; Halász, Baráth et al. 1994]. Konzentrationen ausgewählter biogener Amine in Lebensmitteln sind in Tabelle 2 vergleichend zu Rot- und Weißwein dargestellt. Vergleicht man die unterschiedlichen Produkte, so fällt auf, dass alkoholische Getränke wie Wein, Bier oder Cidre sehr geringe Gehalte an biogenen Aminen aufweisen. Auch andere Studien bestätigen im Vergleich zu anderen Lebensmitteln relativ „geringe“ Konzentrationen in Wein. In italienischen Rotweinen wurden bis zu 6,2 mg/L Histamin bestimmt [Arlorio, Coisson et al. 1999], bei portugiesischen Weinen lagen die Konzentrationen der biogenen Aminen alle unter 5 mg/L [Mafrá, Herbert et al. 1999; Ferreira und Pinho 2006], bei Rotweinen aus Sizilien und Frankreich sogar unter 1 mg/L [Mo Dugo, Vilasi et al. 2006]. Allgemein enthält Rotwein den Literaturangaben zufolge höhere Konzentrationen an biogenen Aminen als Weißwein [Marquardt und Werringloer 1965; Galgano, Caruso et al. 2003]. Zudem treten im Rotwein nach Mayer (1976) und Santos (1995) bei hohen pH-Werten vor allem höhere Gehalte an Histamin auf (pH < 3,6: 2,1 mg/L; pH > 3,8: 7,7 mg/L)

Halász, Baráth et al. (1994) geben einen umfassenden Überblick über verschiedene Lebensmittel und deren Gehalt an biogenen Aminen. So können biogene Amine auch in unfermentierten Früchten und Gemüse nachgewiesen werden. In der Pflanze kann Arginin zu Agmatin decarboxyliert werden, woraus wiederum Putrescin entsteht. Bei Magnesium- und Kaliummangel und gleichzeitiger hoher Ammoniumversorgung der Pflanze sammelt diese Agmatin als auch Putrescin an. Orangesaft ist bekannt für höhere Gehalte an Tryptamin, in Tomaten konnten Tryptamin, Tyramin und Histamin nachgewiesen werden. Spinatblätter enthalten





ebenfalls Histamin. Bei Kakaobohnen entsteht bei der Röstung aus Phenylalanin Phenylethylamin. In Sauerkraut können biogene Amine bei der Milchsäuregärung entstehen. Mayer (1976) empfiehlt daher die Milchsäuregärung bei einem pH-Wert von 4 durch Pasteurisation abubrechen, da gerade in der stationären Phase der Bakterien die Histidindecaboxylaseaktivität am höchsten ist und die Gehalte an Histamin und Tyramin am Ende der Sauerkrautgärung stark ansteigen.

Die Aminosäurendecarboxylasen sind bei pH-Werten unter 4 am aktivsten. In verschiedenen Käsesorten können in einem breiten Spektrum biogene Amine gebildet werden. So konnten in Cheddar bei *Echerichia coli* und *Enterococcus faecals* Tyrosin- und Histidindecarboxylasen nachgewiesen werden [Santos 1995].

**Tabelle 2: Vergleichende Darstellung der Gehalte an biogenen Aminen in ausgewählten Lebensmitteln**

Lebensmittel	Hist	Cad	Put	Tyr	Phen	Sper	Spid	Referenz
Brasilianisches Bier (mg/L) (n = 91)	nd-1,46	nd-2,60	0,85-9,80	0,30-36,80	nd-1,72	nd-6,00	nd-2,05	[Glória und Izquierdo-Pulido 1999]
Chorizo spontanvergoren (mg/kg) (n = 4)*	nd	16	223	85	5	3	2	[González-Fernández, Santos et al. 2003]
Chorizo <i>L.sakei</i> K29 (mg/kg) (n = 4)*	nd	12	238	73	nd	3	9	[Garai, Duenas et al. 2006]
Cidre (n = 24)	nd-6,93	na	nd-12,25	nd-5,03	na	na	na	[Mayer 1976]
Sauerkraut (mg/kg)	100-200	20	max. 20	max. 40	nd	na	na	
Emmentaler (mg/kg) (n = 12)*	339	13,49	10,92	290,64	58,76	<0,1	na	
Sardellenpaste (mg/kg) (n = 1)	612	na	na	na	na	na	na	[Pfannhauser und Pechanek 1984]
Thunfischkonserve (mg/kg) (n = 7)*	47,57	80,5	31,48	6,91	7,26	5,44	na	
Salamirohwurst (mg/kg) (n = 14)*	128,87	171,37	212,47	210,23	28,71	40,42	na	
Rotwein (mg/L) (n = 61)	0-10,77	0-3,15	0-26,45	0-11,32	0-2,24	na	na	[Marcobal, Polo et al. 2005]
Weißwein (mg/L) (n = 38)*	0,8	0,2	1,9	0,8	1	na	na	[Kaschak, Göhning et al. 2009]

\* = Mittelwerte; na = nicht analysiert; nd = not detected



Besonders gereifter Käse weißt öfters höhere Gehalte an Histamin oder Tyramin auf. So enthält frische Milch unter 0,3 ppm Histamin, gereifter Käse hingegen bis zu 2500 ppm [Bodmer, Imark et al. 1999], Halász, Baráth et al. (1994) konnten in Cheddar bis zu 1500 mg/kg Tyramin nachweisen. Der optimale pH-Wert für die Bildung von Tyramin in Käse liegt nach Santos (1995) bei fünf. Auch hier wird ein niedriger pH-Wert als unterstützend für die Bildung biogener Amine angesehen, da Bakterien ihre Decarboxylasen als Verteidigungsmechanismus gegen Säurestress brauchen. In Tabelle 2 sind im Vergleich zwei Gärverfahren bei der Chorizoherstellung hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Bildung biogener Amine aufgezeigt. Um Chorizo mit geringem Gehalt an biogenen Aminen herzustellen müssen Starterkulturen verwendet werden, die den pH-Wert schnell senken und während des Gärprozess dominieren, um das Wachstum anderer Bakterien zu unterdrücken (wie *L. sakei* K29). Glucosegehalte über 0,5% helfen zusätzlich den pH-Wert schnell zu senken. Im Gegensatz zu Sauerkraut oder Käse gilt hierbei folglich so schnell wie möglich den pH-Wert zu senken.

Für die Bildung biogener Amine in Fisch wird *Morganella morganii*, in Fleisch *Lactobacillus brevis*, *L. buchnerii*, *L. hilgardii* verantwortlich gemacht. Zhang, Zhao et al. (2008) berichten von einem Anstieg an Histamin um 18,56 mg/100g auf 20,9 mg/100g, von Tyramin um 13,62 mg/100g auf 19,8 mg/100g, Putrescin von nd auf 23,3 mg/100g und Cadaverin von nd auf 83,4 mg/100g bei einer Lagerung von Fisch während zwei Tagen bei 25 °C.

Da biogene Amine in nicht fermentierten Lebensmitteln als Verderbnisindikatoren herangezogen werden, existiert der sogenannte Biogenic Amine Index (BAI). Bei Fisch und Fleisch steigen die Gehalte an Histamin, Putrescin und Cadaverin bei mikrobiologischem Verderb an, während Spermin und Spermidin abgebaut werden. Somit wird der BAI als  $BAI = \frac{\text{Histamin} + \text{Putrescin} + \text{Cadaverin}}{1 + \text{Spermin} + \text{Spermidin}}$  berechnet, wobei die Konzentrationen in mg/kg einzusetzen sind. Ein BAI >10 deutet auf Verderb hin.

Obleich biogene Amine wie Histamin, Tyramin, Phenylethylamin und Putrescin bei vielen Funktionen im menschlichen Organismus beteiligt sind, kann der Konsum von Lebensmitteln, die biogene Amine in großen Mengen enthalten, toxische Effekte hervorrufen [Mafra, Herbert et al. 1999; Herbert, Santos et al. 2001; Santos, Simonet et al. 2004].

Der Verzehr aminhaltiger Nahrung führt normalerweise nicht zu Gesundheitsstörungen, es sei denn große Mengen werden konsumiert oder der Katabolismus im Körper ist gestört [Halász, Baráth et al. 1994]. Da biogene Amine hochpotente Substanzen sind, ist der menschliche Körper in der Lage sich zu detoxifizieren. Biogene Amine können im Körper durch Enzyme abgebaut werden. Histamin wird durch die Enzyme Diaminoxidase (DAO) und N-Methyltransferase (NMTF) abgebaut [Bobak 2010]. Histamin wird zur Imidazolessigsäure oxydiert, wobei intermediär ein Aldehyd entsteht (Abbildung 13). Die Imidazolessigsäure bildet dann mit Ribose ein Ribosid [Beall 1967; Pfannhauser und Pechanek 1984]. Der Stickstoff im Imidazolring kann auch durch die NMTF methyliert werden, wodurch N-Methylhistamin entsteht, welches wiederum zur N-Methylimidazolessigsäure oxydiert wird. Der Donor für die Methylgruppe ist S-Adenosylmethionin [Karovicová und Kohajdová 2005].



**Abbildung 13: Oxydativer Abbau von Histamin über die DAO zu Imidazolacetaldehyd**

Beide Abbauprodukte werden dann über den Urin ausgeschieden [Kanny, Gerbaux et al. 2001]. In Nahrungsmitteln und Urin konnte auch 4-Methylspinaecamin nachgewiesen werden, welches aus Histamin und Acetaldehyd durch Kondensation entsteht, wobei die Wirkung dieser Substanz noch unbekannt ist [Ohya 2006].

Die Diaminoxidasen haben die Aufgabe, den Körper vor exogenen, bzw. durch von Darmbakterien gebildeten Aminen zu schützen und den Polyaminstoffwechsel zu regulieren [Steneberger 2007]. Diese Amin-abbauenden Enzyme enthalten Kupfer, weshalb der Kupferwert im Blut als Indikator der Ausprägung der Abbaumechanismen dienen kann [Crnoglavac 2004]. Die Wirkung von DAO benötigt zudem Vit B6 (Pyridoxalphosphat) [Jarisch und Wantke 1996].

Neben der DAO existiert im Körper noch die oxydative Desaminierung biogener Amine durch die Monoaminoxidase (MAO). So wird Phenylethylamin durch MAO zu Phenylacetaldehyd metabolisiert, wobei dann das Aldehyd zu Phenylelessigsäure oxydiert und in geringeren Konzentrationen zu Phenylethanol reduziert wird. Dies geschieht hauptsächlich durch die Aldehyddehydrogenase, während die Aldehydoxydase eine untergeordnete Rolle spielt [Panoutsopoulos, Kouretas et al. 2004]. Tyramin wird ebenfalls über die MAO zu *p*-Hydroxyphenylelessigsäure



abgebaut [Smith 1981; Pfannhauser und Pechanek 1984; Jarman 1993]. Aminoxydasen befinden sich in der Leber, der Lunge, der Niere und in der Mucosa des Dünndarms [Pfannhauser und Pechanek 1984; Steneberger 2007] und verhindern die Resorption in den Blutkreislauf. Tyramin kann jedoch schon in der Mundhöhle resorbiert werden, wodurch das körpereigene Detoxifizierungssystem umgangen wird [Mayer 1976]. Histamin, Tyramin und Phenylethylamin gelten als biologisch aktive Amine. Sie besitzen entweder psychoaktive oder vasoaktive Eigenschaften. Dahingegen üben Diamine wie Cadaverin und Putrescin keinen direkt negativen Einfluss auf den Organismus aus, hemmen jedoch den Abbau anderer Amine und potenzieren u.U. die Toxizität von Histamin. Ebenso beschleunigen Alkohol und Acetaldehyd einerseits die Absorption dieser Stoffe und hemmen gleichzeitig die Abbaumechanismen [Lüthy und Schlatter 1983; Shalaby 1996].

Aus diesem Zusammenhang heraus wird deutlich, warum Wein – der verglichen mit anderen fermentierten Lebensmitteln auf Grund niedriger pH-Werte geringe Konzentrationen biogener Amine aufweist – trotzdem als Auslöser diverser Nahrungsmittelunverträglichkeitsreaktionen diskutiert wird. Des Weiteren wirkt sich die Einnahme bestimmter Medikamente negativ auf den Abbau biogener Amine aus. Diese sogenannten Monoaminoxidase-Hemmer werden beispielsweise zur Senkung des Blutdrucks verabreicht und immerhin von ca. 20 % der Bevölkerung eingenommen [Steneberger 2007].

Die Wirkung von biogenen Aminen auf den menschlichen Organismus hängt somit vom Zusammenwirken eines Systems der Anreicherung biogener Amine im Körper (Aufnahme durch die Nahrung oder körpereigene Ausschüttung, ausgelöst durch Allergien) und der Fähigkeit diese Abzubauen ab. Zudem kann die Auswirkung biogener Amine durch sogenannte H1 Blocker (Antihistaminikum) als auch dem Anstieg der DAO – Aktivität bei Schwangerschaft (bei Schwangeren ist das DAO – Level um das 500 fache erhöht) abgeschwächt werden. Im Gegensatz dazu wirken sich Medikamente (Dihydralazin, Metoclopramid, Isoniazid, Valium, Mucosolva, Paspertin), Alkohol und Acetaldehyd in einer Reduzierung der DAO – Aktivität aus [Jarisch und Wantke 1996].

Die Frage, inwieweit biogene Amine eine toxikologische Wirkung auf den Menschen haben können sind konkret für Wein bereits in den 60 er Jahren diskutiert worden. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Personen, die Spirituosen (Whisky) konsumierten, weniger häufig Leberzirrose auftrat als bei Weinkonsumenten. Da im



Fall der Spirituosen durch den Destillationsvorgang im Vergleich zu Wein von einem „reineren“ Produkt auszugehen ist, wurden andere toxische Substanzen untersucht. Zunächst wurde bei Katzen ein Anstieg der Atemaktivität und Abfall des Blutdrucks festgestellt, der durch Weinkonsum hervorgerufen wurde. Eine Wasser/Ethanol-Lösung blieb ohne Effekte. Bei Zugabe des Antihistamins Neoantergan blieb bei denselben Katzen der Effekt nach Weinkonsum aus. Ein weiterführender Versuch mit Meerschweinchen führte bei oraler Aufnahme von 200 mg Histamin zu 40 % Todesrate, bei 200 mg Histamin in 15 % vol. alkoholischer Lösung zu 75 % Todesrate [Marquardt und Werringloer 1965]. Somit konnte vermutet werden, dass die Kombination aus Alkohol und Histamin gesundheitsgefährdende Wirkungen auch auf den menschlichen Organismus haben kann. Als Schlussfolgerung kommt es nach Marquardt und Werringloer (1965) bei häufigem Genuss von histaminhaltigem Wein zu chronischer Leberzirrhose. Weine, die über 3 mg/L Histamin enthalten, stellen nach Mayer (1976) ein gewisses Risiko dar, da es in manchen Fällen zu Unbekömmlichkeitserscheinungen kommen kann. Bei den Versuchen von Lüthy und Schlatter (1983) wurden an 27 Probanden die Effekte der Verabreichung von vier verschiedenen Weinen mit natürlichen Amingehalten in unterschiedlichen Mengen (Histamin n.n.–21 ppm; Tyramin 1–32 ppm; Phenylethylamin n.n.–6 ppm; Putrescin 2–55 ppm) untersucht. Hierbei wurde ausschließlich eine kopfschmerzauslösende Wirkung von Phenylethylamin als statistisch gesicherter Befund diagnostiziert. Ab einer Dosis von 5 mg Phenylethylamin wurden bei empfindlichen Versuchspersonen Kopfschmerzen, Hitzegefühl und Schwindel hervorgerufen. Phenylethylamin wirkt nicht selbst auf die cerebrale Blutversorgung, sondern bewirkt in der Lunge die Ausschüttung vasoaktiver Stoffe; erhöhte Gehalte an Phenylethylamin im Urin werden hauptsächlich nach Stress gefunden. Es bestand insgesamt jedoch kein Zusammenhang zwischen den in der Literatur beschriebenen Symptomen und den Gehalten an Histamin oder Tyramin. Lüthy und Schlatter (1983) schließen aus ihren Ergebnissen, dass diskutierte Grenzwerte von 2-10 mg/L Histamin in Wein nicht zu halten sind, da es keine Hinweise gibt, dass solch tiefe Grenzwerte aus toxikologischen Gründen gerechtfertigt wären. Dagegen spricht die Arbeit von Jarman (1993), der bei neun von elf Probanden, die zuvor angegeben hatten sensitiv auf Rotwein zu reagieren, feststellte, dass diese auf den Weinkonsum mit Migräne reagierten. Er führt dies auf einen erhöhten Gehalt an Tyramin in den spanischen



Weinen zurück. Dieser Versuch ist jedoch etwas zweifelhaft, da den Probanden zum Vergleich Wodkazitrone-Mixgetränk ausgeschrieben wurde und davon auszugehen ist, dass die Probanden gustatorisch wohl unterschieden konnten, welches Getränk sie gereicht bekamen, auch wenn der Versuch in dunklen Gläsern mit Strohhalmen durchgeführt wurde.

Ähnlich wie Lüthy und Schlatter (1983) äußern sich Kanny, Gerbaux et al. (2001). Weder mit histaminarmem Wein (0,4 mg/L) noch mit histaminreichem Wein (13,8 mg/L) konnte bei 16 Personen eine signifikante Aussage bezüglich der Reaktionen getroffen werden. Es konnte nach Konsum des histaminarmen Weines ein Anstieg des Plasmahistamingehaltes beobachtet werden, wobei kein Unterschied in der Ausscheidung von Methylhistamin oder Imidazolessigsäure festgestellt werden konnte. Die Autoren schließen daraus, dass der Anstieg des Plasmahistamingehaltes durch Substanzen erklärt werden kann, die im Körper zu einer Ausschüttung von Histamin führten. Als mögliche Substanz wird Acetaldehyd aufgeführt. Abschließend stellen die Autoren fest, dass es keinen Zusammenhang zwischen „Weinintoleranz“ und dem Histamingehalt von Weinen gibt und dass weitere Substanzen wie Acetaldehyd verstärkt untersucht werden müssen. Leider wird in dieser Arbeit nicht beschrieben wie der Histamingehalt in den Versuchswinen bestimmt wurde; in Anbetracht der Literatur erscheint ein Histamingehalt von fast 14 mg/L außergewöhnlich hoch, ebenso ist ein Histamingehalt von 0,4 mg/L in Abhängigkeit der Methode unterhalb der Quantifizierungsgrenze.

Steneberger (2007) greift sehr treffend auf, dass Histaminintoleranz (HIT) keine durch Immunoglobuline vermittelte Allergie ist und somit als Pseudoallergie zu bezeichnen ist. In Zusammenhang mit HIT stehen in internationalen Krankheitsnomenklaturen die Histaminkopfschmerzen und die Scrombriod-Fischvergiftung. HIT selbst ist nicht als Krankheitsbild anerkannt. „Es mangelt bisher an Beweisen für einen direkten Zusammenhang zwischen oraler Aufnahme biogener Amine und Nahrungsmittelintolleranzreaktionen“.

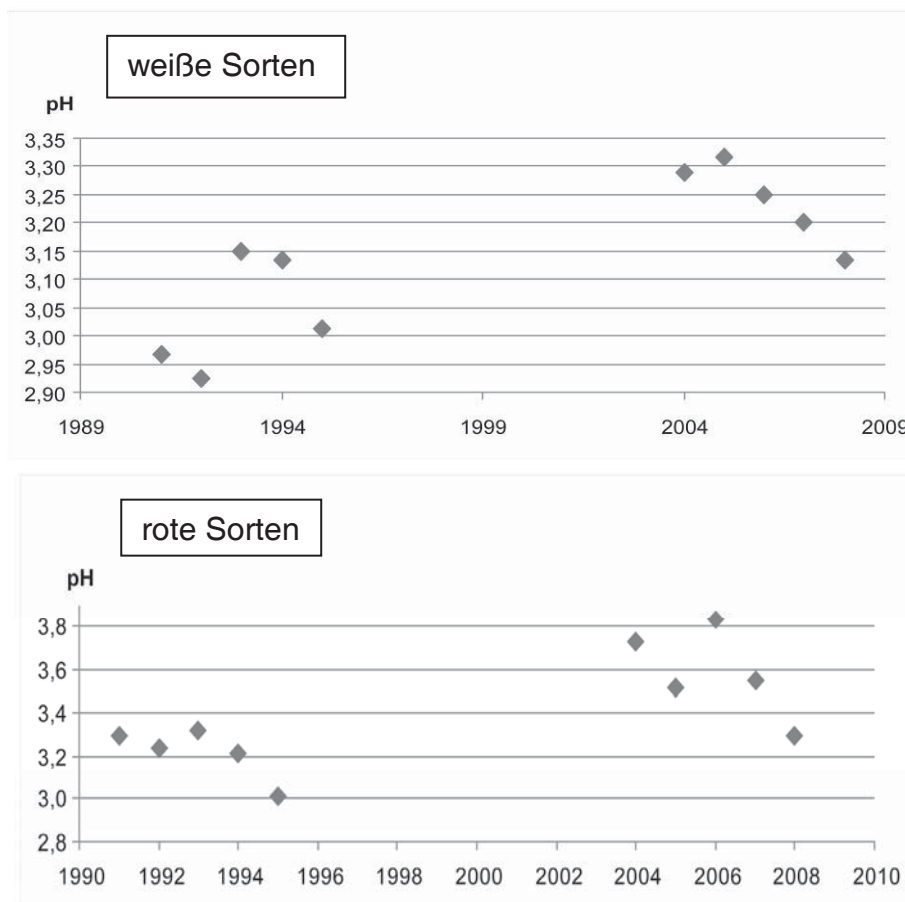
Es bleibt offen, inwieweit biogene Amine im Zusammenhang mit Ethanol und Acetaldehyd (Wein) wirklich allergische Symptome hervorrufen können. Zu beobachten bleibt zusätzlich die gesundheitliche Beeinträchtigung durch die Bildung von Ethylcarbamat aus Ethanol und Carbamidsäure, welches als krebserregend eingestuft ist [Nout 1994] und die Bildung von Nitrosaminen die ebenfalls cancerogen sind und bei deren Bildung Amine als Vorstufen fungieren können [Smith 1981].



### 3.4 Relevanz biogener Amine für die Weinwirtschaft

Für den aufgeklärten Verbraucher rückt der gesundheitliche Aspekt eines Lebensmittels zunehmend in den Fokus, wobei ein erhöhter Gehalt an biogenen Aminen den Anforderungen diametral gegenübersteht.

Klimatische Bedingungen, aber auch oenologische Verfahren, wie etwa eine verlängerte Maischestandzeit, führten in den letzten Jahren zu einem Anstieg der pH-Werte im Most. Hohe pH-Werte begünstigen die Vermehrung von Schadbakterien und somit auch die Gefahr einer verstärkten Bildung biogener Amine. Bei der Bildung biogener Amine spielt der pH-Wert eine bedeutende Rolle. Bei höheren pH-Werten ist von einer höheren mikrobiellen Aktivität und Diversität auszugehen, zudem sinkt die mikrobiozide Wirkung der  $\text{SO}_2$  [Würdig und Woller 1989]. So werden bei höherem pH- Wert verstärkt biogene Amine gebildet [Gardini, Zaccarelli et al. 2005].



**Abbildung 14: pH-Wertveränderungen innerhalb von zehn Jahren. Oben weiße Sorten (Mittelwert aus Weißburgunder, Grauburgunder und Riesling n= 540). Unten rote Sorten (Mittelwert aus Dornfelder, Spätburgunder und Portugieser n = 575). Datenquelle: Hill LVWO-Weinsberg**





Wie in Abbildung 14 sowohl für Weißweine als auch für Rotweine zu erkennen ist, stiegen in den letzten Jahren die pH-Werte bei der Lese kontinuierlich an. Der Anstieg ist zwar nicht linear, aber im Durchschnitt der Jahre 2004 – 2009 ist im Vergleich zum Durchschnitt 1990 -1994 einen Anstieg von 0,2 Einheiten bei den weißen Sorten und 0,3 Einheiten bei den roten Sorten zu beobachten. Die Schwelle von pH 3,4, ab der die Vermehrung der Schadbakterien *Lactobacillus* und *Pediococcus* möglich ist, wird in Zukunft immer häufiger bereits bei der Lese überschritten werden.

Bisher galt nur in der Schweiz ein Richtwert für eine Obergrenze an Histamin von 10 mg/L. Dieser wurde 2010 aufgehoben, da die OIV (Organisation internationale de la vigne et du vin) aktuell an der Verabschiedung eines „Code des bonnes pratiques vitivinicoles en vue de limiter au maximum la présence d’amines biogènes dans les vins“ arbeitet. Empfehlungen bestehen nach der European Cooperation in Science and Technology (COST) 917 für Frankreich mit 8 mg/L und Deutschland mit 2 mg/L [Lethonen 2002]. Im Rahmen von COST 922 (Health Implications of Dietary Amines) wurden EU-weite Grenzwerte in Wein für Histamin gefordert.

Auch wenn zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit weder ein Grenzwert existiert, der die Verkehrsfähigkeit deutscher Weine gefährden könnte, noch ein geklärter Zusammenhang zwischen Weinkonsum und

Nahrungsmittelunverträglichkeitsreaktionen oder einer negativen sensorischen Beeinträchtigung der Weinqualität durch biogene Amine existiert, bleibt die Frage der mikrobiologischen Qualitätskontrolle ein relevantes Thema für die Weinwirtschaft, um langfristig die Wettbewerbsfähigkeit und Weinqualität zu garantieren. Um einen aktuellen Überblick über das Vorkommen und den Gehalt an biogenen Aminen in deutschen Weinen zu erhalten, wurde im Jahr 2008 ein Screening durchgeführt. Da viele Weine über große Handelsketten verkauft werden, wurden 57 Rot- und Weißweine verschiedener Rebsorten in Großmärkten zur Analyse ausgewählt. Betrachtet man den Gesamtgehalt an biogenen Aminen in diesen Weinen, so konnte festgestellt werden, dass 38 Weißweine 14 mg/L und 14 Rot- und Roséweine zwischen 11,6 mg/L und 25,9 mg/L biogene Amine aufwiesen; vier Rotweine lagen deutlich über diesen Werten mit Gesamtgehalten von bis zu 83,7 mg/L. Somit kann man sagen, dass auch deutsche Rotweine allgemein höhere Amingehalte als deutsche Weißweine besitzen [Kaschak, Göhring et al. 2009; König, Pfeiffer et al. 2009].



Die biogenen Amine Ethanolamin, Ethylamin, Isopentylamin und Putrescin wurden in allen Weinproben nachgewiesen. Phenylethylamin war in 95 %, Tyramin in 89 % aller Weine vorhanden. Auch Histamin konnte in den meisten Weinen (77 %) detektiert werden, wohingegen Cadaverin in 39 % und Hexylamin in 18 % der Weine zu finden war. Dagegen konnten Serotonin und Tryptamin in keinem der Weine nachgewiesen werden.

Zu beobachten war, dass die Konzentrationen von Histamin vergleichsweise gering war. Sie lag abgesehen von zwei Weinproben unter 1,8 mg/L. Der maximale Gehalt betrug 7,2 mg/L. Für Tyramin wurden Durchschnittswerte zwischen 2,0 bzw. 3,2 mg/L in Rot- und Roséweinen ermittelt. Putrescin wies Konzentrationen von durchschnittlich 2,0 mg/L in Rotweinen auf.

### **3.5 Einfluss weinbaulicher und oenologischer Faktoren auf die Bildung biogener Amine**

Das Vorkommen biogener Amine in Wein ist in der Literatur seit geraumer Zeit gut dokumentiert. Trotz allem sind die Zusammenhänge zwischen der Entstehung biogener Amine und den Faktoren, die das quantitative und qualitative Auftreten beeinflussen, derzeit noch nicht eindeutig geklärt [Herbert, Cabrita et al. 2005; García-Marino, Trigueros et al. 2010]. Zudem stehen die einzelnen Faktoren in Wechselbeziehungen, was die Aussage über den Beitrag einzelner Faktoren auf die Bildung biogener Amine erschwert [Ancín-Azpilicueta, González-Marco et al. 2010]. Ihre Bildung ist abhängig von der Aktivität bestimmter Mikroorganismen, sowie von der Anwesenheit der entsprechenden freien Aminosäuren, Gärdauer und Temperatur, Kontaktzeit des Mosts mit den Beerenschalen, eingesetzte Menge SO<sub>2</sub>, pH-Wert, Dauer des Hefelagers und zahlreichen anderen Faktoren. Biogene Amine können schon im Most vorhanden sein, hierbei sind speziell Polyamine als wichtiger Bestandteil lebender Zellen [Silla - Santos 1996] oder Schutzfaktoren gegen Pflanzen stressende Umwelteinflüsse [Bouchereau, Aziz et al. 1999] zu nennen. Putrescin, Spermin und Histamin sind natürlicher Bestandteil der Trauben [Vidal-Carou, Codony-Salcedo et al. 1990; Hajos, Sass - Kiss et al. 2000], wobei nach Hajos, Sass - Kiss et al. (2000) Spermin noch vor Putrescin das häufigste biogene Amin in Trauben ist, was von Fernandes und Ferreira (2000) sowie González Marco, Jiménez Moreno et al. (2006) bestätigt werden kann [Fernandes und Ferreira 2000; González Marco, Jiménez Moreno et al. 2006]. Andere Studien berichten von



abweichender Zusammensetzung der Traube bzw. gewonnen Moste an biogenen Aminen. So sind die flüchtigen Amine wie Methylamin, Ethylamin, Diethylamin, Isoamylamin, 2 – Phenylethylamin oder Pyrrolidin in den Trauben zu finden [Ough, Daudt et al. 1981]. Putrescin liegt in großen Mengen im Most vor, wobei auch Histamin nachgewiesen werden kann [Desser 1981]; Cadaverin liegt in roten Maischen in größeren Konzentration als Putrescin oder Phenylethylamin (respektive 2,58 mg/L; 2,35 mg/L; 2,01 mg/L) vor [Marcobal, Martín-Álvarez et al. 2006]. Die Konzentrationsdynamik von Polyaminen in ihrer metabolischen Funktion als Wachstumsfaktoren von Zellen wurde bei Syrah und Grenache Noir untersucht [Bauza, Kelly et al. 2007]. Spermin und Spermidin werden aus Putrescin gebildet, welches selbst wiederum in der Beere aus Ornithin oder aus Arginin über Agmatin gebildet wird. Höchste Konzentrationen der drei Polyamine können bei beiden Rebsorten zum Zeitpunkt der Blüte festgestellt werden, wobei der Spermidingehalt vor Putrescin und Spermin am höchsten ist. Ab der Blüte nimmt der Gehalt aller Polyamine bis zum Fruchtansatz ab, um dann auf einem konstanten Niveau zu bleiben. Für den Reifeprozess der Beere scheinen diese Polyamine somit keine bedeutende Rolle mehr zu spielen. Der Arginingehalt steigt bis zur Reife hin stark an, nachdem er bei beiden Rebsorten zwischen Blüte und Fruchtansatz stark abnimmt und seinen Tiefpunkt findet. Ab dem Fruchtansatz werden viele wertgebende Inhaltsstoffe in die Beere eingelagert und die Konzentrationsabnahme an Arginin zum Fruchtansatz lässt auf seine Implementierung in die Proteinsynthese schließen. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass die Biosynthese von Polyaminen in der Traubenbeere aus Arginin über Agmatin erfolgt. Nach Ancin-Azpilicueta, Gonzales-Marco et al. (2008) fanden Bertrand, Ingargiola et al. (1991), dass die Stickstoffdüngung bei Merlot zu einem Anstieg der N-Verbindungen im Most führt, wozu aber auch die biogenen Amine Histamin, Putrescin, Cadaverin und Phenylethylamin zählen, die durch die erhöhte N-Versorgung der Reben in ihrer Konzentration zugenommen haben. Ein breit angelegter Versuch mit mehreren Rebsorten über drei Jahrgänge konnte hingegen klar nachweisen, dass kein kausalen Zusammenhang zwischen der Stickstoffversorgung der Reben und einer daraus folgenden Synthese von biogenen Aminen besteht [Smit 2009].

Die Zusammensetzung und Konzentration an biogenen Aminen, die in unterschiedlichen Mosten nachgewiesen wurden, findet ihren Ursprung aber nicht nur in der traubeneigenen Biosynthese, sondern werden auch durch Umwelteinflüsse



beeinflusst. In Italien wurde der Einfluss der Traubenstandzeit auf den Gehalt biogener Amine bei den Rebsorten Chardonnay, Riesling und Sauvignon blanc untersucht. Trauben, die steril (Waschung mit konzentrierter Schwefelsäurelösung und sterilem Wasser) direkt bei der Annahme im Keller verarbeitet wurden, enthielten nur Ethanolamin (0,92 mg/L – 1,74 mg/L), Ethylamin (1,34 mg/L – 2,20 mg/L) und Putrescin bei Riesling und Sauvignon blanc (0,58 mg/L – 0,62 mg/L). Als einzige Rebsorte enthielten die Chardonnaytrauben zusätzlich noch Tyramin (0,80 mg/L). Bei den nicht gewaschenen Trauben hingegen war im Most bei allen Rebsorten Histamin (0,29 mg/L – 0,40 mg/L) und Cadaverin (0,28 mg/L – 0,37 mg/L) vorhanden. Während der Lagerung der Trauben bis zu 48 Stunden vor der Weiterverarbeitung ist ein signifikanter Anstieg aller biogener Amine zu verzeichnen. Gesamtamine übersteigen bei Riesling und Sauvignon blanc 30 mg/L und bleiben bei Chardonnay knapp unter 30 mg/L. Bei allen Rebsorten steigt der Histamingehalt von nicht nachweisbar in den gewaschenen Trauben auf über 5 mg/L an. Der Anstieg des Gesamtamingehaltes und die Bildung von Histamin kann somit nicht pflanzenphysiologisch erklärt werden, sondern durch die Mikroflora auf den Beeren, auch wenn visuell gesundes Lesegut vorliegt [Cecchini und Morassut 2010]. Höhere Konzentrationen an biogenen Aminen im Most können zudem durch Fäulnis belastetes Traubenmaterial auftreten. Eine fäulnisbedingte Zunahme der biogenen Amine Ethanolamin, Putrescin, Histamin, Phenylethylamin, Isopentylamin und Tyramin konnte auch von Smit (2009) belegt werden. Bei Solitärinfektionen im Labormasstab mit *P. expansum* und *B. cinerea* hingegen konnte die im Freiland beobachtete Zusammensetzung biogener Amine nicht reproduziert werden. Phenylethylamin und Isopentylamin wurden im Labor nicht durch die Fäulniserreger gebildet. Smit (2009) vermutet, dass die Bildung dieser biogenen Amine eine Reaktion der Rebe auf den Fäulnisbefall ist. Auch berichten Hajos, Sass-Kiss et al. (2000); Sass-Kiss und Hajos (2005) von einem höheren Gehalt an biogenen Aminen in botrytisfaulem Lesegut und den daraus resultierenden Aszú Tokajer. Eine umfassende Studie über die Gehalte und Zusammensetzung biogener Amine in französischen Weinen unterschiedlicher Anbauggebiete konnte hingegen zeigen, dass Weine aus dem Sauternes nach Rotweinen aus Bordeaux geringere Konzentrationen an biogenen Aminen aufweisen, als elsässische Weißweine, Champagner oder Weine aus dem Burgund [Soufleros, Barrios et al. 1998]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses der Fäulnis könnten durch die verschiedenen



Verarbeitungsweisen von Sauternes und Tokajer zu erklären sein. Beide Weine entstehen durch den Einfluss der Edelfäulnis, wobei ein Sauternes mit dem aus den faulen Trauben gewonnen Mostes vinifiziert wird, ein Aszú Tokajer durch Mazeration gewisser Anteile (butt) fauler Trauben im Grundwein, also ohne weiteren Gärungsprozess, entstehen kann. Durch den Gärprozess kann eine Veränderung der Zusammensetzung biogener Amine im Produkt erfolgen, so wird beispielsweise nach Desser, Bandion et al. (1981) Spermidin während der alkoholischen Gärung abgebaut.

Neben der bereits aufgeführten aktuellen Studie über die Gehalte biogener Amine in deutschen Weinen gibt es in fast allen europäischen weinbaubetriebenden Ländern und vereinzelt in der „neuen Welt“ Studien, die ein Screening der Gehalte biogener Amine in kommerziell erhältlichen Weinen durchführten. In 54 Rotweinen, 15 Roséweinen und 15 Weißweinen aus dem Rhôneetal konnten alle Polyamine in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, wobei nur Agmatin und Putrescin Gehalte über 1 mg/L erreichten. Die Gehalte biogener Amine waren in den Rotweinen höher als in den anderen Weinen [Bauza, Blaise et al. 1995]. Deutlich höhere Gehalte an biogenen Aminen werden von spanischen Weinen berichtet, wobei auch hier Rotweine höhere Gehalte aufweisen als Weiß- oder Roséweine. Speziell gereifte Rotweine (Gran reserva) enthalten im Durchschnitt hohe Gehalte an Tyramin (5,98 mg/L), Putrescin (36,10 mg/L) und Cadaverin (1,36 mg/L), wobei der Histamingehalt mit 5,12 mg/L sogar etwas niedriger lag als der von jungen Rotweinen mit 8,72 mg/L [Vazquez-Lasa, Iniguez-Crespo et al. 1998]. Eine Studie von 30 portugiesischen Weinen konnte solche Konzentrationen nicht widerspiegeln. Die Gehalte von Histamin, Tyramin oder  $\beta$ -Phenylethylamin lagen allesamt unter 5 mg/L [Mafrá, Herbert et al. 1999]. Von ähnlich niedrigen Werten (unter 8 mg/L) berichten Leitao, Marques et al. (2005) [Leitao, Marques et al. 2005]. Konzentration an Histamin, Tyramin und Tryptamin liegen nach Anli, Vural et al. (2004) in türkischen Rotweinen maximal bei respektive 0,29 mg/L; 1,96 mg/L und 7,94 mg/L [Anli, Vural et al. 2004]. Untersuchungen aus den Jahrgängen 1991 und 1992 konnten für Pinot Noir (Spätburgunder) und Cabernet Sauvignon aus Oregon rebsortenabhängige Unterschiede feststellen. Auch wenn diese Weine ebenfalls kommerziell erworben wurden und in keinem vergleichbaren Verfahren hergestellt wurden, so zeigte sich doch, dass Pinot Noir signifikant höhere Gehalte an Putrescin, Histamin,  $\beta$ -Phenylethylamin und Gesamtamine aufweist als die Cabernet Sauvignon



Weine, die wiederum durch höhere Cadaverin und Spermidinergehalte charakterisiert sind [Glória, Watson et al. 1998]. Das Auftreten biogener Amine kann nicht nur einen Aufschluss über eine gesundheitliche „Unbedenklichkeit“ kommerziell erhältlicher Weine, bezogen auf einzelne Weinbaugebieten oder Rebsorten, geben sondern wird mittlerweile auch herangezogen, um den Aspekt „Typizität“ bzw. „Authentizität“ zu beurteilen. So kann der Pyrrolidingehalt als Markersubstanz für das Alter von Portweinen herangezogen werden [Ferreira und Pinho 2006] oder einzelne biogene Amine zusammen mit Polyphenolen zur Differenzierung und somit als Authentizitätsnachweis für die Herkunft aus unterschiedlichen italienischen Anbaugebieten von Rotweinen beitragen [Galgano, Caruso et al. 2011]. Die Ergebnisse der letztgenannten Arbeit sind jedoch fraglich. Unter dem Aspekt, dass der Polyphenolgehalt nicht nur rebsortenabhängig ist, sondern auch vom Klima und der Stickstoff-, Wasserversorgung der Rebe abhängt, ebenso wie auch der Gehalt an biogenen Aminen in den Weinen von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, die kaum etwas mit der Authentizität eines Anbaugebietes zu tun haben, ist die von den Autoren gezogene Schlussfolgerung kritisch zu betrachten. Zu den maßgeblichen Faktoren, unter denen es bei der Weinbereitung zu einer möglichen Bildung biogener Amine kommen kann, zählen die alkoholische Gärung und der biologische Säureabbau [Soufleros, Barrios et al. 1998; Goni und Azpilicueta 2001; Lonvaud-Funel 2001; Caruso, Fiore et al. 2002; Guerrini, Mangani et al. 2002; Marco, Moreno et al. 2006; Landete, Ferrer et al. 2007; Marques, Leitao et al. 2008]; Faktoren, die nur schwer verallgemeinernd auf spezifische Anbaugebiete zu übertragen sind. Welcher der beiden Fermentationsprozesse ausschlaggebend für die Bildung biogener Amine im Wein ist wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So steigt der Gehalt von Putrescin, Histamin und Cadaverin während der Spontanvergärung nach Desser, Bandion et al. (1981) an. Im direkten Vergleich der Spontangärung (nach Mostschwefelung mit 80 mg/L) zum Einsatz von Reinzuchthefen bei Chardonnay ziehen Torrea und Ancín (2002) eine positive Bilanz bezüglich der Spontanvergärung. Während der Vergärung mit Reinzuchthefen werden die Aminosäuren Histidin und Arginin stärker verstoffwechselt, was im Vergleich zur Spontangärung zu höheren Gehalten an Putrescin und Histamin führt. Es muss in diesem Zusammenhang jedoch erwähnt werden, dass die Spontangärungsvarianten nicht durchgegoren waren und einen signifikant höheren Gehalt an flüchtiger Säure von 0,9 g/L aufwiesen. Ebenfalls mit der Rebsorte





Chardonnay und der Spontanvergärung (nach Mostschwefelung mit 60 mg/L) stieg der Gehalt an Putrescin während der ersten Hälfte der Gärung um 471 % an, während bis zu diesem Zeitpunkt weder Histamin noch Tyramin gebildet wurden. Erst nach Ende der Gärung wurden auch Histamin und Tyramin gebildet, der höchste Gehalt wurde für Putrescin mit knapp über 4 mg/L angegeben. Während des BSAs mit Starterkulturen steigt der Gehalt biogener Amine nicht mehr. Die Autoren gehen davon aus, dass Nicht – *Saccharomyces* kaum biogene Amine bilden können und dass durch den Einsatz von BSA – Starterkulturen ein weiterer Anstieg der biogenen Aminen vermieden werden kann [González Marco, Jiménez Moreno et al. 2006]. Bei einer vergleichenden Untersuchung des Einflusses von Hefe- und BSA-Starterkulturen (*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* und *Oenococcus oeni* DSM 7008 und 12923) bei Merlot konnte festgestellt werden, dass durch den BSA höhere Gehalte an Serotonin und Gesamtaminen entstehen. Die Gärung mit *Saccharomyces cerevisiae* führte zu signifikant erhöhten Gehalten an Spermidin und im Vergleich der Milchsäurebakterien konnten signifikant höhere Gehalte an Serotonin durch *Lactobacillus plantarum* gebildet werden. Weder Putrescin noch Cadaverin wurden durch spontane alkoholische Gärung noch durch *L. plantarum* gebildet [Manfroi, Silva et al. 2009]. Um den Gehalt biogener Amine die, unabhängig von einem Vergleich zum BSA, während der alkoholischen Gärung entstehen, zu beeinflussen, sollte bei der Maischegärung roter Sorten auf ein ausreichendes Austreiben der Gärungskohlensäure geachtet werden. Unter Einsatz des sehr anaerob arbeitenden Ganimedesystems kommt es unabhängig von der Rebsorte (Syrah, Cabernet Sauvignon, Merlot) zu höheren Gehalten an biogenen Aminen als bei einer klassischen Maischegärung. Beim Ganimedeprinzip wird das endogene CO<sub>2</sub> zum Überschwappen genutzt. Die Anreicherung an CO<sub>2</sub> im Medium kann zu einer Modifikation der Zellwände führen, was ein passives Eindringen von Protonen und somit eine intrazelluläre Ansäuerung möglich macht. Die Hefe reagiert darauf mit der Decarboxylierung von Aminosäuren, wodurch die biogenen Amine entstehen [Ancín-Azpilicueta, González-Marco et al. 2010]. Dennoch kommt es nach Marcobal et al. (2006) auch bei einer traditionellen Maischegärung unter Einsatz von Reinzuchthefen zur Bildung von Ethylamin und Phenylethylamin.

Caruso, Fiore et al. (2002) konnten bei der alkoholischen Gärung unter Verwendung verschiedener Hefegattungen und -stämmen keine Bildung von Histamin, Putrescin, Methylamin, Tryptamin und Cadaverin feststellen. Bei Hefen der Gattung





*Saccharomyces cerevisiae* wurde v.a. eine Zunahme von Ethanolamin, Phenylethylamin und Agmatin beobachtet. Auch wenn es keine allgemeingültige Regel für die Entwicklung und den Gehalt biogener Amine im Wein gibt, gilt aber in der Regel die Feststellung, dass Hefen nicht für die Bildung der am häufigsten in Wein auftretenden biogenen Amine verantwortlich sind [Lonvaud-Funel 2001]. Demgegenüber konnte eine Zunahme der Amingehalte in Chardonnayweinen beobachtet werden, die ein längeres Hefelager durchliefen, wenn dabei die Hefe wöchentlich aufgerührt (frz. *bâtonnage*) wird. So konnten nach 180 Tagen im aufgerührten Wein signifikant mehr Gesamtamine (33,3 mg/L) im Vergleich zur Kontrolle ohne Aufrühren (29,7 mg/L) nachgewiesen werden. Der Effekt des Anstieges manifestierte sich nach etwa 100 Tagen deutlich, wobei bei beiden Varianten im Vergleich zur Lagerung ohne Hefekontakt schon nach 90 Tagen mehr biogene Amine auftreten. Bei beiden Varianten der Reifung auf der Vollhefe kommt es zu einem Anstieg von über 200 % an Putrescin. Die *bâtonnage* führt speziell zu einer deutlichen Zunahme von Tyramin (+ 68 %), auch ein gesteigerter Histamingehalt (+ 21,4 %) wurde nachgewiesen [González-Marco und Ancin-Azpilicueta 2006a]. Dabei wurden erstaunlich hohe Endkonzentration erreicht, für Tyramin 4,2 mg/L und für Histamin sogar 12 mg/L. Diese Beobachtungen sind nicht auf einen spontanen BSA zurückzuführen, da Starterkulturen eingesetzt wurden. Dennoch wird mit einem Anstieg der Aminosäurenkonzentration durch die Hefeautolyse und einer verbleibenden Decarboxylaseaktivität von Bakterien argumentiert. Ähnlich verhält es sich bei der Zugabe von Hefeautolysat. In der Weinbereitung werden in den letzten Jahren vermehrt diese sogenannten Hefezellwandpräparate eingesetzt um die Hefen in der alkoholischen Gärung durch die Anreicherung des Mediums mit Aminosäuren und langkettigen Fettsäuren zu unterstützen. Durch den Einsatz eines solchen Präparates stieg ebenfalls bei Chardonnay der Gesamtamingehalt nach BSA um 2 mg/L im Vergleich zur Kontrolle. Da der BSA wiederum mit nach Herstellerangaben decarboxylasefreien Starterkulturen durchgeführt wurde, liegt der Ausgangssachverhalt ähnlich wie bei der Hefeautolyse durch ein langes Hefelager. Entweder ist der höhere Gehalt mit einer Freisetzung von biogenen Aminen aus dem Zytoplasma der Hefen bei der Autolyse zu erklären, oder durch verbleibende und aktive Decarboxylasen nach dem BSA, die durch die Zugabe des Autolysates eine höhere Ausgangskonzentration an, als Vorstufen fungierenden, Aminosäuren vorfinden [González Marco, Jiménez



Moreno et al. 2006]. Beide Studien belegen den Einfluss der Hefeautolyse bei der Bildung biogener Amine, wahrscheinlich ist der Ursprung aber auf bakterielle Aktivität zurückzuführen, zumal der Anstieg biogener Amine, sicherlich verstärkt durch die Hefeautolyse, erst Wochen nach Ende des BSAs stattfindet. Diese Feststellung konnte schon 1990 bei einigen spanischen Weinen gemacht werden. So begann gegen Ende oder drei Wochen nach Ende des Äpfelsäureabbaus die Bildung von Tyramin und Histamin [Vidal-Carou, Ambatlle-Espunyes et al. 1990]. Für die Bildung von biogenen Aminen ist nach Lonvaud-Funel (2001) im Wesentlichen die Aktivität von Bakterien, die in der Lage sind Aminosäuren zu decarboxylieren, verantwortlich. Bezüglich des Zeitpunkts der Bildung wird hier gerade bei Rotweinen auf die reduzierte Wirksamkeit der  $\text{SO}_2$  durch höhere pH-Werte und der Polyphenole verwiesen, wodurch der Gehalt biogener Amine auch manchmal vier bis sechs Wochen nach beendetem BSA weiter ansteigen kann. Zudem ist nicht von der Hand zu weisen, dass im Wein lebende aber nicht kultivierbare Bakterien (viable non culturable bacteria VBNC) vorhanden sind, deren Decarboxylaseaktivität ihr Überleben ermöglicht. So kann man die Ergebnisse, dass ältere Weine höhere Gehalte an biogenen Aminen aufweisen und die negative Korrelation von Äpfelsäure und Zitronensäure mit dem Gehalt biogener Amine, nur auf den biologischen Säureabbau und verbleibende Decarboxylaseaktivität zurückführen [Soufleros, Barrios et al. 1998]. Diese Beobachtungen ziehen sich durch die Mehrzahl aller Literaturquellen, nach Herbert, Cabrita et al. (2005) steigt direkt nach dem BSA der Gehalt an Tyramin und Putrescin an, während Histamin erst während der weiteren Reifung gebildet wird. Bei Marcobal, Martin-Álvarez et al. (2006) steigt der Gehalt von Histamin und Tyramin während und nach dem BSA, um dann aber bei einem Gehalt von 40 mg/L freier  $\text{SO}_2$  konstant zu bleiben. In einer griechischen Kellerei bei der über Jahre bei einem spontanen BSA *Oenococcus oeni* Stamm MF1 dominierte, sind kaum biogene Amine gebildet worden. Dennoch steigt durch den BSA der Gehalt an Putrescin, Tyramin und Phenylethylamin [Pramateftaki, Metafa et al. 2006]. Nach Bauza, Kelly et al. (2007) stieg durch den BSA der Gehalt von Putrescin, Spermin und Spermidin. Wie deutlich sich der Einfluss vor allem des spontanen BSAs auswirkt, konnte anschaulich von einer spanischen Arbeitsgruppe gezeigt werden. Im Vergleich zur Vermeidung des BSA (500 mg/L Lysozym und 50 mg/L  $\text{SO}_2$ ) und des kontrollierten BSA (Starterkulturen nach 20 mg/L Lysozym und 20 mg/L  $\text{SO}_2$  vor der Gärung) steigt der Gehalt aller untersuchter biogener Amine in allen Varianten mit



durchlaufenem BSA. Nach vier Monaten erreicht die Histaminkonzentration bei Tempranillo sogar 16 mg/L, bei Cabernet Sauvignon 7 mg/L [Hernández-Orte, Lapeña et al. 2008]. Auch mit der italienischen Rebsorte Sangiovese wurde in Technikumsversuchen der Einfluss der Spontanflora beim BSA auf die Bildung biogener Amine untersucht. Die isolierten, biogene Amine bildende, *Oenococcus oeni* Stämme wurden auf Weine beimpft, die mit unterschiedlichen Hefen vergoren waren. Die Bildung der biogenen Amine war stark stammabhängig und abhängig von der Weinzusammensetzung, die wiederum abhängig von der eingesetzten Hefe unterschiedlich war. Bei den Weinen, bei denen auch der biologische Säureabbau beendet war, wurden bei zwei Stämmen ab dem zehnten Tag Histamin und Tyramin gebildet, die Bildung setzte sich bis zum 25ten Tag nach Ende des Äpfelsäureabbaus fort. Nach Abbau der Zitronensäure und einer reduzierten Zahl der CFU setzte sich die Bildung fort um nach 30 Tagen Gehalte zwischen 3 und 4 mg/L Histamin und 10 mg/L Tyramin zu erreichen [Rosi, Nannelli et al. 2009]. Außer den bereits genannten möglichen Faktoren, die eine direkte Einflussnahme auf die Bildung und das Vorhandensein biogener Amine in Trauben, Most und Wein nehmen, wurden zahlreiche weitere Untersuchungen zur Ergründung möglicher Quellen für das Vorkommen biogener Amine betrieben. Leider beschränkt sich dabei die Literatur in der Regel auf Untersuchungen von Weinen, die entweder aus dem Handel erworben wurden oder von unterschiedlichen Kellereien bezogen werden konnten. Versuche unter weitestgehend kontrollierten und definierten Bedingungen, die von der Traubenverarbeitung bis zum Wein mögliche Einflussfaktoren abdecken, sind selten. Welchen Einfluss unterschiedliche technologische Maßnahmen und Co-faktoren bei der Weinbereitung auf die Bildung biogener Amine haben, kann anhand zweier Quellen anschaulich dargestellt werden (Tabelle 3). Bei beiden Quellen basieren die Erkenntnisse aus Weinen, die nicht unter Technikumsbedingungen vinifiziert wurden, sondern aus der Weinwirtschaft stammen, dennoch sind die untersuchten Einflussfaktoren und mögliche Korrelationen glaubhaft dokumentiert. Basierend auf einer großen Datengrundlage findet man in Rotweinen mit einem Gehalt unter 50 mg/L gesamtter SO<sub>2</sub> signifikant mehr Histamin und Tyramin. Ein Fakt, der wiederum die Bedeutung der mikrobiologischen Stabilisierung der Weine während der Reifung unterstreicht. Bei Weiß – und Roséweinen konnte deutlich gezeigt werden, dass hohe Gehalte an flüchtiger Säure mit erhöhten Gehalten an Histamin und Tyramin korrelieren, für Rotweine gilt nach Vidal- Carou, Ambatlle-



Espunyes et al. (1990) diese Feststellung nicht. Die Studien von Martín-Álvarez, Marcobal et al. (2006) beleuchten sehr anschaulich, wie sich unterschiedliche oenologische Maßnahmen und der Jahrgang auf die Bildung biogener Amine auswirken. Deutlich wird, dass signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Jahrgängen aufgetreten sind. Der Jahrgang 2001 hebt sich signifikant vom Jahrgang 2002 durch hohe Gehalte aller untersuchter biogener Amine ab. Leider findet sich kein Hinweis auf die den einzelnen Jahrgängen zugrundeliegenden Charakteristiken, wie Gesundheitszustand der Trauben, Stickstoffversorgung oder ähnliches. Einen Einfluss auf die Jahrgangsunterschiede kann auch das Saft/Beerenhaut Verhältnis bei der Maischegärung haben, was sich auch in der Dauer der Maischesstandzeit widerspiegelt. Eine Maischstandzeit über zehn Tage hat einen signifikanten Anstieg an Histamin, Tyramin und Putrescin zur Folge. Dies unterstreicht den Bedarf an Versuchen, die unter möglichst kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Der Einsatz pektolytischer Enzyme, bei der Rotweibereitung häufig zur Farbextraktion eingesetzt, hat kaum signifikanten Einfluss auf die Bildung biogener Amine, der Gehalt an Phenylethylamin war durch Einsatz von 2 g/100 kg Enzym sogar geringer.

**Tabelle 3: Gehalte biogener Amine (mg/L) in Wein und ausgewählte Einflussfaktoren**

	Anzahl der Proben	Hist	Tyr	Phen	Put	Cad
<i>Gesamte SO<sub>2</sub> (mg/L) I</i>		**	**			
< 50	56	5,91	3,62			
50 - 150	31	2,54	2,3			
> 150	11	1,2	1,91			
<i>Flüchtige Säure (g/L)<sup>ab</sup> I</i>		**	**			
< 0,5	30	0,42	0,95			
0,5 - 0,7	28	0,58	1,42			
> 0,7	13	1,91	3,41			
<i>Jahrgang II</i>		**	**	*	**	
2001	117	4,87 ± 0,67	2,12 ± 0,55	3,36 ± 0,5	9,69 ± 1,24	1,16 ± 0,44
2002	107	1,44 ± 0,69	0,62 ± 0,57	2,29 ± 0,52	4,70 ± 1,29	1,60 ± 0,46
<i>pektolytische Enzyme II</i>				**		
2 g/100 kg	62	3,55 ± 0,81	1,77 ± 0,67	1,79 ± 0,61	6,31 ± 1,51	0,83 ± 0,53
-	162	2,76 ± 0,59	0,96 ± 0,49	3,86 ± 0,44	8,08 ± 1,10	1,93 ± 0,39
<i>Hefelager II</i>			**		**	
2 Monate	65	2,49 ± 0,78	0,43 ± 0,64	2,97 ± 0,58	10,46 ± 1,45	1,55 ± 0,51
-	159	3,82 ± 0,63	2,30 ± 0,52	2,68 ± 0,47	3,93 ± 1,18	1,21 ± 0,42
<i>Maischestandzeit II</i>		**	**		**	
< 10 Tage	123	1,83 ± 0,58	0,51 ± 0,47	2,70 ± 0,43	3,32 ± 1,07	1,02 ± 0,38
> 10 Tage	101	4,48 ± 0,79	2,22 ± 0,65	2,95 ± 0,59	11,07 ± 1,46	1,74 ± 0,52
<i>BSA II</i>		**	*			*
Starterkulturen	31	1,41 ± 1,04	0,37 ± 0,86	2,99 ± 0,78	7,05 ± 1,94	0,67 ± 0,69
spontan	193	4,89 ± 0,40	2,37 ± 0,33	2,67 ± 0,30	7,34 ± 0,74	2,09 ± 0,26

a = als Essigsäure berechnet; b = Weißwein und Rosé;

\* signifikant für  $P = 95\%$ ; \*\* signifikant für  $P = 99\%$

I [Vidal-Carou, Codony-Salcedo et al. 1990] ; II [Martin-Alvarez, Marcobal et al. 2006]

Der Einfluss des Hefelagers ist im Vergleich zu den Studien von González-Marco und Ancin-Azpilicueta (2006a) bei Chardonnay in diesem Fall weniger deutlich zu beurteilen. Der Gehalt an Tyramin ist nach zwei Monaten Hefelager geringer als ohne Hefelager, wobei durch das Hefelager signifikant mehr Putrescin in den Wein gelangt oder gebildet wird. Die viel diskutierte Rolle des biologischen Säureabbaus wird hier noch einmal sehr deutlich. Der Einsatz von Starterkulturen erwies sich als erfolgreiche präventive Strategie, um die Gehalte an Histamin, Tyramin und Cadaverin möglichst gering zu halten. Im Gegenzug birgt ein spontaner, unkontrollierter BSA die Gefahr, dass diese Substanzen vermehrt gebildet werden. Most und Wein sind sehr selektive Medien, die nur bestimmte Milchsäurebakterien in ihrem Wachstum unterstützen. Die homofermentativen *Lactobacilli* sind die am häufigsten in Trauben auftretenden Milchsäurebakterien. Sie verschwinden jedoch recht schnell im Verlauf der alkoholischen Gärung, die dann eher das Wachstum von *Leuconostoc mesenteroides* begünstigt, welcher gegen Ende der Gärung von



*Oenococcus oeni* ersetzt wird [Moreno-Arribas, Polo et al. 2003]. Diesem obliegt bei der Weinbereitung aufgrund seiner Alkoholtoleranz und Verträglichkeit niedriger pH-Werte, eine besondere Rolle. Im Rahmen der Untersuchung zur Bestimmung der Fähigkeit zur Bildung biogener Amine durch *Oenococcus oeni* konnten Guerrini, Mangani et al. (2002) zeigen, dass dieser in signifikantem Maße zum Gesamtamingehalt in Wein beitragen kann. Hierbei spielt der pH-Wert eine erhebliche Rolle, so ist bei verhältnismäßig niedrigen pH-Werten von einer geringeren mikrobiologischen Aktivität und Diversität auszugehen. Zudem sinkt der Wirkungsgrad von SO<sub>2</sub> mit steigendem pH-Wert und unterbindet nicht zwangsläufig alle durch Bakterien verursachten biochemischen Reaktionen. Bei hohen pH-Werten werden biogene Amine generell in höherem Maße gebildet [Glória, Watson et al. 1998; Lonvaud-Funel 2001; Guerrini, Mangani et al. 2002; Gardini, Zaccarelli et al. 2005], wobei es nach Leitao, Marques et al. (2005) sowie Manfroi, Silva et al. (2006) keinen signifikanten Zusammenhang gibt. Die Rolle der SO<sub>2</sub> und des pH-Wertes scheint aber hauptsächlich einen Einfluss während des BSAs und der Reifung der Weine zu spielen, da nachgewiesen werden konnte, dass bei gefüllten Flaschen, die dann mehrere Tage geöffnet gelagert wurden, zwar die freie SO<sub>2</sub> abnahm, der Gehalt an Histamin und Tyramin aber unverändert blieb [Vidal-Carou, Codony-Salcedo et al. 1991]. Etwas differenzierter sieht es aus, wenn frisch gefüllte Weine während der Lagerung untersucht werden. So kann es zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen, die auch von der Lagertemperatur der Flaschen abhängen. Bei Chardonnay der den BSA durchlaufen hatte konnte festgestellt werden, dass der Gehalt an Histamin bei einer Lagertemperatur von 20 °C nach 105 Tagen signifikant zunahm. Bei allen Lagertemperaturen (4 °C; 20 °C und 35 °C) steigt innerhalb der ersten 45 Tage der Gehalt an Putrescin, Cadaverin und Tyramin und verharrt dann auf einem konstanten Niveau, einzig der Tyramingehalt nimmt wieder ab. Dies lässt sich mit einer im Wein verbleibenden aktiven Enzymaktivität der Bakterien erklären, wobei vor allem die Histidindecaboxylase bei 20 °C aktiver ist als bei den niedrigen oder zu hohen Temperaturen. Die Abnahme an Tyramin ist auf die Aktivität der Tyraminoxidase zurückzuführen [González-Marco und Ancin Azpilicueta 2006b]. Zudem ist in einem solchen Produkt das Medium für die Bildung von Histamin prädestiniert, da unter den ärmsten Nährstoffbedingungen (Fehlen von vergärbaren Produkten wie Zucker oder Äpfelsäure) mehr Histamin gebildet wird [Lonvaud-Funel und Joyeux 1994].





Hinsichtlich eines möglichen Zusammenhanges zwischen biogenen Aminen und anderen Wein- oder Mostparameter ist nach Jakob (1978) eine Kopplung von Histaminbildung und Milchsäure sowie flüchtiger Säure zu beobachten [Jakob 1978]. Aussagen über den Zusammenhang zwischen den als Vorstufen dienenden Aminosäuren und den korrespondierenden biogenen Aminen sind bei Studien die direkt am Wein und nicht im Modellmedium durchgeführt wurden kaum zu finden. Während beispielsweise Torrea und Ancín (2002); Marcobal, Martín-Àlvarez et al. (2006) und Hernández-Orte, Lapeña et al. (2008) feststellen konnten, dass die Histaminbildung mit dem Abbau von Histidin korreliert, gibt es nach Souffleros, Barrios et al. (1998) keinen Zusammenhang zwischen einzelnen Aminosäuren und den biogenen Aminen, wohl aber zwischen Gesamtamingehalt und Gesamtkonzentration an Aminosäuren. Aus dem zum momentanen Stand der Literatur dokumentierten Wissen um die Bildung biogener Amine im Zuge der Weinbereitung lassen sich prinzipiell Maßnahmen ableiten, die zu Weinen mit möglichst geringem Gehalt dieser Stoffgruppe führen. So gilt es nach Desser, Bandion et al. (1981) mit Reinzuchthefen zu arbeiten und Mikroorganismen aus dem Wein zu entfernen, „sobald die technologisch notwendige Stoffwechselleistung erbracht ist“. Nach Martín-Alvarez, Marcobal et al. (2006) oder Hernández-Orte, Lapeña et al. (2008) sind bei erwünschtem BSA Starterkulturen einzusetzen, die keine oder kaum biogene Amine bilden können. Laut Rosi, Nannelli et al. (2009) ist es nach beendetem Äpfelsäureabbau wichtig, sofort die Bakterien abzutrennen, da es erst im Anschluss zu einem signifikanten Anstieg an biogenen Aminen kommt. Allgemein helfen alle Maßnahmen, die eine Hemmung oder Verhinderung des Wachstums unerwünschter Bakterien hervorrufen. Hierzu zählen neben der Verwendung von Starterkulturen der Einsatz thermischer Verfahren wie die Maischerhitzung oder Flash-pasteurisierung bei der Rotweinbereitung, ausreichende Schwefelung, starke Filtration und der Einsatz von Lysozym [König 2008]. Als kurative Strategie empfiehlt sich der Einsatz von Bentonit, wodurch es möglich ist bereits gebildetes Histamin zu entfernen [Jakob 1968]. Einen ebenso kurativen Ansatz jedoch auf biochemisch, mikrobiologischem Wege ist der Einsatz von Milchsäurebakterien, die gebildete biogene Amine wieder über Aminoxydasen verstoffwechseln. Es konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus casei* IFI-CA 52 im Labormaßstab bis zu 54 % Histamin abbauen kann. Dennoch ist der Einsatz bei der





Weinbereitung momentan nicht möglich, da der Abbau durch SO<sub>2</sub>, Polyphenole und Ethanol gehemmt wird [García-Ruiz, González-Rompinelli et al. 2011].

### 3.6 Analytik biogener Amine

Histamin im Wein wurde als erstes biogenes Amin 1945 von Tarantola nachgewiesen [Busto, Guasch et al. 1996]. Mit der Verbesserung der Analysetechniken wurden neben Histamin andere biogene Amine in einer Vielzahl von Lebensmitteln aber auch der Medizin charakterisiert.

Die meisten Methoden basieren auf der chromatographischen Trennung der biogenen Amine und deren qualitativem sowie quantitativem Nachweis mit Hilfe unterschiedlicher Detektionsverfahren.

Die Spannbreite der chromatographischen Auftrennung geht dabei in allen Bereichen von der Dünnschichtchromatographie auch thin layer chromatography (TLC) genannt [Beyer und van den Ende 1983; Sebastian, Herr et al. 2011] über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high-performance liquid chromatography/HPLC) [Pfeiffer 1996] oder UPLC (ultra performance liquid chromatography) [Dadáková, Krizek et al. 2009] bis zur Gaschromatographie (GC) [Fernandes, Judas et al. 2001].

Nach momentanem Kenntnisstand der Literatur haben sich hinsichtlich der Analytik biogener Amine seit 1996 [Busto, Guasch et al. 1996; Lethonen 1996] kaum grundlegende Veränderungen getan, die gängigste Methode zur Analyse von biogenen Aminen bei alkoholischen Getränken aber auch anderen Lebensmitteln erfolgt mittels HPLC. Die eingesetzten HPLC-Methoden unterscheiden sich maßgeblich in den unterschiedlichen Probenaufbereitungsverfahren, den unterschiedlichen Derivatisierungsverfahren, der Detektion sowie der Quantifizierung.

Grundsätzlich ist die Probenaufbereitung bei Wein einfacher als bei anderen Lebensmitteln [Hernández-Cassou und Saurina 2011], dennoch setzten einige Autoren PVP (Polyvinylpyrrolidon) ein, um die Analytik störende Polyphenole aus Rotweinen zu entfernen [Busto, Valero et al. 1994; Loukou und Zotou 2003a, b; Zotou, Loukou et al. 2003; Hernandez-Borges, D'Orazio et al. 2007].

Die Probenaufbereitung bleibt dennoch ein wichtiger Schritt bei der Analytik, da Wein eine komplexe Matrix darstellt, die nicht nur Störkomponenten enthalten kann



sondern auch viele N-Verbindungen, die zu sogenannten falsch positiven Ergebnissen führen können [Pena-Gallego, Hernández-Orte et al. 2009].

Dennoch gibt es einige Arbeiten, die ohne spezielle Probenaufbereitung wie Festphasenextraktion (solide phase extraction/SPE) oder Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid extraction/LLE) arbeiten [Marcobal, Polo et al. 2005; Mo Dugo, Vilasi et al. 2006; Kelly, Blaise et al. 2010]. Die gängigste Methode der Probeaufbereitung, um die Störkomponenten wie Aminosäuren zu entfernen und die Analyten (biogenen Amine) aufzukonzentrieren, ist die SPE, wobei unterschiedliches Säulenmaterial entweder als Ionenaustauscher oder als Umkehrphasen (C18-Kartuschen) eingesetzt wird [Ibe, Saito et al. 1991; Pfeiffer und Radler 1992; Busto, Valero et al. 1994; Busto, Guasch et al. 1995; Pfeiffer 1996; Arlorio, Coisson et al. 1999; Loukou und Zotou 2003b; Zotou, Loukou et al. 2003; Hernandez-Borges, D'Orazio et al. 2007; Pena-Gallego, Hernández-Orte et al. 2009; Hernández-Cassou und Saurina 2011]. Pena-Gallego, Hernández-Orte et al. (2009) folgern aus ihren Ergebnissen, dass eine Probenaufbereitung mittels SPE für die Bestimmung von Histamin und Tyramin nötig ist, um Co-elutionen zu vermeiden.

Bei nicht flüssigen Lebensmitteln bietet sich die LLE an, wobei es dabei wichtig ist störende Fette und Proteine, etwa mit Trichloressigsäure, auszufällen [Saaïd, Saad et al. 2009]. Auch in der Getränkeanalytik kommt die LLE zum Einsatz, wobei Chloroform [Garcia-Villar, Saurina et al. 2006] oder Butanol [Arlorio, Coisson et al. 1999] als Lösungsmittel eingesetzt werden können. Sowohl Busto, Guasch et al. (1995) als auch Arlorio, Coisson et al. (1999) sprechen sich gegen die LLE und für die SPE aus, da dadurch eine bessere Wiederfindungsrate und Präzision erzielt werden kann. Weitere Verfahren der Probenaufbereitung sind Weiterentwicklungen der LLE. So schlagen Romero, Jönsson et al. (2002) die Methode der supported liquid membrane (SLM) Technik vor, wobei auf eine Membran di-2-ethylhexylphosphorsäure aufgetragen wird. Diese Membran fungiert als Anionenträger, wodurch die biogenen Amine in saurer Lösung ( $\text{pH} < \text{pK}_a$  der biogenen Amine) extrahiert werden können. Somit wird die Extraktion polarer oder stark polarer biogener Amine wie Histamin, Cadaverin oder Spermin erleichtert [Romero, Jönsson et al. 2002]. 2011 veröffentlichten Huang, Jin et al. das Verfahren der ionic liquid-based ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction (IL-UALLME) für Bier. Mittels 1-Butyl-3-methylimidazolium-Hexafluorophosphat werden die biogenen Amine Octopamin, Tyramin und Phenylethylamin extrahiert [Huang, Jin et



al. 2011]. Biogene Amine sind selbst nicht mit UV- oder Fluoreszenzdetektoren zu erfassen. Dies setzt zur Bestimmung eine Derivatisierung voraus. Die gebräuchlichsten, zur Derivatisierung genutzten Verbindungen sind *o*-Phthaldialdehyd (OPA) und Dansyl Chlorid (DnsCl). *o*-Phthaldialdehyd bildet mit N-Verbindungen wie Aminosäuren oder biogenen Aminen selbst keine Derivate, die der Fluoreszenzdetektion zugänglich sind. Es benötigt zur Derivatisierungsreaktion zudem eine S-Verbindung, damit die der Fluoreszenz zugänglichen Isoindol-Derivate gebildet werden können. Als S-Verbindungen kommen dabei 2-Mercaptoethanol [Petridis und Steinhart 1995; Pfeiffer 1996; Mafra, Herbert et al. 1999; Male und Luong 2001; Alberto, Arena et al. 2002; Marcobal, Polo et al. 2005; Garai, Duenas et al. 2006] oder N-acetyl-L-cystein [Kelly, Blaise et al. 2010] zum Einsatz.

OPA reagiert ausschließlich mit primären Aminen, jedoch schneller als DnsCl und ermöglicht den Nachweis verhältnismäßig geringer Konzentrationen mittels der sensitiven Fluoreszenzdetektion. DnsCl hingegen bildet auch Derivate mit sekundären, sowie einigen tertiären Aminen aus, zudem sind diese Derivate stabiler [Petridis und Steinhart 1995; Busto, Guasch et al. 1996; Loukou und Zotou 2003b], was auch eine Derivatisierung vor der SPE ermöglicht [Hernandez-Borges, D'Orazio et al. 2007; Proestos, Loukatos et al. 2008]. Alle Arbeiten, bei denen die Derivatisierungen mit DnsCl durchgeführt werden, arbeiten ohne automatisierte Derivatisierung [Ibe, Saito et al. 1991; Busto, Valero et al. 1994; Galgano, Caruso et al. 2003; Loukou und Zotou 2003a; Zotou, Loukou et al. 2003; Mo Dugo, Vilasi et al. 2006; Proestos, Loukatos et al. 2008; Dadáková, Krizek et al. 2009; Saaid, Saad et al. 2009]. Zur Ausbildung stabiler Derivate benötigt es mindestens 30 Minuten, wobei Temperaturen von bis zu 65°C eingehalten werden müssen, um eine möglichst optimale Derivatisierung zu erreichen [Zotou, Loukou et al. 2003]. Somit ist eine Automatisierung der Vorsäulenderivatisierung (Autosampler) nicht möglich, was die Analytik wiederum im Vergleich zur Derivatisierung mit OPA zeitintensiver und kostenaufwändiger gestaltet. Zudem kann es beim Einsatz von DnsCl zu mehreren Reaktionsprodukten kommen, was die Substanzidentifizierung und Quantifizierung erschwert. Ebenso kann DnsCl mit Polyphenolen, aliphatischen Alkoholen und Zuckern reagieren, was eine intensivere Probenaufbereitung zur Folge hat. Vorteil der Derivatisierung mit DnsCl ist, dass die Derivate sowohl mit Fluoreszenz- als auch UV-Detektion nachweisbar sind [Loukou und Zotou 2003b].



Weitere Derivatisierungsreagenzien versuchen die Nachteile von DnsCl und OPA zu kompensieren oder finden schon seit längerer Zeit ihren Einsatz in der Analytik biogener Amine aber auch von Aminosäuren. Für die Bestimmung biogener Amine in Bier setzen Huang, Jin et al. (2011) 2,6-Dimethyl-4-quinolincarboxylsäure-N-hydroxysuccinimidester (DMOC-QSu) ein, welches sowohl mit primären als auch sekundären biogenen Aminen reagiert und im Gegensatz zu DnsCl kaum Nebenprodukte bildet, wobei auch hier die Derivatisierung manuell erfolgt. Ebenfalls in der Bieranalytik ist auch die Vorsäulenderivatisierung mit 4-Chloro-3,5-Dinitrobenzotrifluorid (CNBF) möglich. Weitere Reagenzien sind 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamat (AQC9) [Pena-Gallego, Hernández-Orte et al. 2009], für primäre biogene Amine in Lebensmitteln 3-(4-chlorobenzoyl)-quinolin-2-carboxaldehyd (Cl-BQCA) [Zhang, Zhao et al. 2008] oder 2-Naphtyloxycarbonylchlorid (NOC-Cl) [Kirschbaum, Busch et al. 1997], für die simultane Bestimmung von Aminosäuren und biogenen Aminen Diethyl-Ethoxymethylenmalonat [Gomez-Alonso, Hermosin-Gutierrez et al. 2007] oder N-(9-fluorenmethoxycarbonyloxy)succinimid (Fmoc-OSu) [Lozanov, Petrov et al. 2004], LLE von 1,2-Naphthoquinon-4-Sulfonat – derivaten (NQS) [Garcia-Villar, Saurina et al. 2006] bis hin zur Synthese spezieller Reagenzien für die Bestimmung biogener Amine in Äpfeln und Wein durch Derivatisierung mit 8-phenyl-(4-oxy-acetic acid N-hydroxysuccinimide ester)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (TMPAB-OSu) [Li, Wang et al. 2006], wobei es hierbei selbst mit aufwändiger Synthese bei manueller Derivatisierung bleibt und nur Spermin, Spermidin, Phenylethylamin, Cadaverin und Putrescin quantitativ bestimmt werden konnten. Derivatisierung einzelner biogener Amine kann unter Umständen ebenfalls mit spezifischen Derivatisierungsmethoden erfolgen, so die Bestimmung von Ethanolamin in Wein mit 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC) [Pfeiffer und Radler 1992], welches auch bei der Aminosäureanalytik eingesetzt werden kann [Jámbor und Molnár-Perl 2009] oder für Histamin mittels Phenylisothiocyanat (PITC) [Calull, Marcé et al. 1991]. Die Derivatisierung von Aminosäuren mittels FMOC findet sich in aktuellerer Literatur kaum noch, was auf die von Jámbor, Molnár-Perl (2009) aufgezeigten Schwierigkeiten für die Bestimmung von Histidin und Tyrosin, die beide zwei Derivataddukte bilden, zurückgeführt werden kann. Als „traditionell“ verwendete Reagenzien sind Ninhydrin [Csomós und Sarkadi 2002] und Dabyschlorid (DabsylCl) [Romero 2001; Romero, Jönsson et al. 2002] zu erwähnen.



Als klassische Detektoren der Derivate werden UV-Detektoren für den UV/Vis-Bereich bzw. Diodenarray-Detektoren/DAD (hauptsächlich für DnsCl-Derivate [Mo Dugo, Vilasi et al. 2006; Saaid, Saad et al. 2009]) und Fluoreszenzdetektoren/FD (hauptsächlich für OPA-Derivate [Pfeiffer 1996; Marcobal, Polo et al. 2005]) eingesetzt. In den letzten Jahren kommt, durch die Weiterentwicklung der Technik, auch vermehrt die Massenspektrometrie LC-MS zur Anwendung. Dies kann zur Überprüfung der Derivatisierungsaddukte mittels LC-atmospheric pressure chemical ionisation MS in Kombination mit einem klassischen DAD erfolgen (HPLC-DAD-APCI-MS) [Loukou und Zotou 2003b]. Gleichzeitig aber auch zur direkten Analytik der biogenen Amine ohne Probenaufbereitung mittels electrospray ionisation iontrap MS (LC-ESI ITMS), wodurch die Analysenzeit deutlich auf 20 Minuten gekürzt werden kann [Millan, Sampedro et al. 2007]. In der klinischen Chemie setzen sich Methoden mit hohem Probendurchsatz, geringer Probenvorbereitung und geringer Analysenzeit bei gleichzeitig präziser Quantifizierung geringster Konzentrationen einer Vielzahl biogener Amine durch. So findet in diesem Bereich die LC-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ihr Einsatzfeld, wobei auch über Stabilisotopen als interne Standards quantifiziert werden kann [De Jong, De Vries et al. 2011]. Abgesehen von speziellen massenspektromerischen Detektoren und dem möglichen Einsatz von Stabilisotopen stellt sich bei allen anderen HPLC-Methoden, unabhängig von Probenaufbereitung, Art der Derivatisierung oder des Detektors die Frage der Quantifizierung. Problem dabei ist, dass keine analytfreien Weine bestehen. Guter Lösungsansatz ist die Erstellung von Kalibrationsgeraden im Modellwein [Busto, Guasch et al. 1996] und die Quantifizierung über mindestens einen internen Standard (IS). Als IS kommen 1,7 – diaminoheptan [Romero 2001; Alberto, Arena et al. 2002; Galgano, Caruso et al. 2003; Loukou und Zotou 2003b; Zotou, Loukou et al. 2003; Lozanov, Petrov et al. 2004; Dadáková, Krizek et al. 2009], 2-amionheptansäure [Lozanov, Petrov et al. 2004; Pena-Gallego, Hernández-Orte et al. 2009], Cycloheptylamin [Garcia-Villar, Saurina et al. 2006] und Heptylamin [Pfeiffer 1996; Santos, Simonet et al. 2004; Kaschak, Göhring et al. 2009] zum Einsatz.

GC-Methoden finden sich in der Literatur nur selten und setzen eine Derivatisierung der biogenen Amine voraus, um Sie zu verflüchtigen. Die Bestimmung flüchtiger Amine in Trauben und Weinen wurde 1980 zum ersten Mal mit GC-MS nach Derivatisierung der Amine mittels Trifluoressigsäureanhydrid beschrieben [Daudt und



Ough 1980]. Für die Analytik biogener Amine in Bier beschreiben Fernandes, Judas et al. (2001) ebenfalls eine GC-MS Methode, wobei hier mit Isobutylchloroformat derivatisiert wird und insgesamt acht interne Standards (fünf davon als deuterisierte Isotopenanaloge) eingesetzt werden. Neben den unterschiedlichen klassischen chromatographischen Verfahren sind in der Literatur vereinzelt auch alternative Methoden vorgeschlagen. Die Kapillarelektrophorese von OPA/Mercaptoethanolderivaten im Komplex mit Cyclodextrin mit folgender FD ist für Urin, Fisch und Wein beschrieben [Male und Luong 2001]. Ebenfalls mit Kapillarelektrophorese arbeiten Santos, Simonet et al. (2004), wobei Heptylamin als IS verwendet wird und die Detektion mittels Elektrospray MS (CE-ESI-MS) erfolgt. Marcobal, Polo et al. (2005) vergleichen bei spanischen Rotweinen ELISA mit HPLC-FD und kommen zum Ergebnis, dass sich auch der Immunoassay sehr gut eignet, um Histamin selektiv in den Proben nachzuweisen. Weitere analytische Ansätze sind der Einsatz von Microchipelectrophorese mit Chemilumineszenzdetektion in menschlichem Urin [Zhao, Huang et al. 2009] oder der Einsatz von Biosensoren, die in Fischproben den Gesamtamingehalt als Qualitätskontrolle bestimmen [Alonso-Lomillo, Domínguez-Renedo et al. 2010].

Eine schnelle und kostengünstige enzymatische Methode zur Bestimmung des Histamingehaltes in Wein ist ebenfalls möglich [Landete, Ferrer et al. 2004]. Diese Methode basiert auf dem enzymatischen Abbauweg von Histamin im menschlichen Körper über die Diaminoxidase (DAO). Unter Mitwirkung der Horseradishperoxidase (HRP) wird die auf den Abbau von Histamin folgende Farbänderung von Diaminobenzidin spektralphotometrisch bestimmt.

### **3.7 Sensorischer Einfluss biogener Amine**

Einige in Wein auftretende Fehleraromen werden auf die Aktivität bestimmter Mikroorganismen zurückgeführt. So sind verschiedene sekundäre Metabolite der malolaktischen Gärung aromaaktive Substanzen (Diacetyl, flüchtige Säure), die gegebenenfalls zu einer geschmacklichen Beeinträchtigung führen. Da die hierfür verantwortlichen Bakterien wiederum maßgeblich an der Bildung von biogenen Aminen beteiligt sind, wirft dies die Frage auf, inwiefern bzw. ob diese eine aromabeeinflussende Wirkung haben.

Vorab sei ein Zitat aus dem Jahre 1999 angeführt. Bodmer, Imark et al. (1999) stellen sich die Frage, wie Lebensmittel produziert werden können, damit sie geringe





Histamingehalte aufweisen, ohne die sensorischen Qualitätsaspekte des Produktes zu verändern. „Since histamine does not at all influence organoleptic characteristics of foods, its unwanted presence – even in relatively high concentrations – or its absence does not influence taste or flavour” [Bodmer, Imark et al. 1999]. Trotz dieser selbstbewussten Aussage ist die Literatur, die sich im speziellen mit dem sensorischen Einfluss biogener Amine befasst, spärlich. Erste Veröffentlichungen stammen aus dem Bereich der Bierherstellung. Palmand, Hardwick et al. (1969) untersuchten unter Zugabe verschiedener Amine (Methylamin, Ethylamin, n-Propylamin, Iso-Butylamin, N,N-Dimethylamin, n-Hexylamin) deren Effekt auf die Aromatik von Bier. Sechs erfahrene Prüfer sollten hierbei speziell auffallende Aromakomponenten beschreiben. Dabei kam man zum Ergebnis, dass die in Bier vorliegenden Konzentrationen biogener Amine keinen Effekt auf die Geschmacksausprägung ausüben. Lediglich bei Zugabe der dreifachen Menge biogener Amine konnten einige signifikante Unterschiede festgestellt werden; so wurden diese Biere vornehmlich als „flach“ bezeichnet. Eine geringere Bitterkeit, sowie ein rauer, scharfer Geschmack wurden attestiert. Insgesamt wurden die Biere durch Zugaben hoher Aminkonzentrationen als stumpf bzw. flach beschrieben [Palmand, Hardwick et al. 1969]. Slaughter und Uvgard (1971) prüften ebenfalls den Einfluss einiger Amine auf das sensorische Erscheinungsbild von Bier. Wobei ausschließlich die höchsten Konzentrationen an Dimethylamin und Ethanolamin (8,2 mg/L) signifikante Unterschiede hervorbrachten. Dabei kamen die Prüfer zu keinem Konsens hinsichtlich einer bestimmten Geschmacksausprägung. Es wurde jedoch ebenfalls ein dumpfer, abgeschwächter Geschmack, sowie eine leicht betäubende Wirkung auf den Geschmackssinn beschrieben. Abschließend wurde festgestellt, dass die untersuchten Amine keinen ernst zu nehmenden Einfluss auf den Geschmack von Bier haben [Slaughter und Uvgard 1971]. Wackes, Herwald et al. (2006) untersuchten speziell den Einfluss des Histamingehaltes unterschiedlicher Biere auf deren sensorische Wahrnehmung. Von zehn geschulten Verkostern konnte jedoch nur eine Person bei einem Triangeltest die abweichende histaminhaltige Probe erkennen. Bei der Beschreibung von aminhaltigen Bieren wurden die Attribute „Reizung des Rachens“; „kribbelnde Zunge“; „Anschwellen der Mundschleimhaut“ als charakteristisch für den „specific taste“ gewählt. Diese sensorische Charakterisierung steht aber in keiner Korrelation zu den analytisch bestimmten Konzentrationen in den ausgewählten Bieren [Wackes, Herwald et al. 2006]. Auch in anderen Lebensmitteln





scheint dem sensorische Beitrag biogener Amine kaum Bedeutung beigemessen zu werden, einzig bei Fisch wird der sehr „fischige“ Geruch durch Trimethylamin dominiert [Santos 1995] oder bei Käse, wobei der scharfe Geschmack und das betäubende Geschmacksempfinden von gereiftem Käse auf Tyramin zurückgeführt wird [Ardö 2006]. Während in der modernen Weinbereitung typische Fehleraromen immer seltener auftreten, nehmen die unspezifischeren Ursachen für Qualitätsminderung zu (dumpf, biologisch verändert, frühzeitig gealtert, gestresst). So wurden durch flüchtige biogene Amine, wie Cadaverin oder Putrescin, negative Effekte festgestellt. Die betreffenden Weine wurden als dumpf beschrieben - auch eine Maskierung des Sortenaromas fiel auf. Dabei verkosteten 24 Verbraucher Rotweine, denen Putrescin oder Cadaverin zugegeben wurde. Circa ein Drittel der Verkoster konnte einen Mangel feststellen, diesen jedoch nicht identifizieren. Beschrieben wurden Gerüche nach verfaulten Früchten sowie ranziger Geschmack oder Gäraromen. Unter Zugabe von Cadaverin wurden die Weine als fleischig betitelt, sowie essigartig und generell unsauber. Interessanterweise wurden bei Putrescin Mängel bei höheren Gehalten nicht besser herausgeschmeckt, als dies vorher bei niedrigeren der Fall war. Bei Cadaverin war diese Differenzierung jedoch vorhanden [Palacios, Suárez et al. 2004]. Rohn, Page et al. (2005) bestimmten in Wasser einen Schwellenwert für Histamin bei 0,43 mg/L, wobei Histamin selbst keinen spezifischen Geschmack aufweist, sondern zu Irritationen im Mundraum führt. Ebenso konnten die Verkoster spanische Rotweine auf einer Skala von eins bis neun aufsteigend nach ihrem Histamingehalt anordnen. Die Autoren gehen davon aus, dass gut trainierte Verkoster erhöhte Histaminkonzentrationen auch in Rotweinen herauschmecken können [Rohn, Page et al. 2005]. Hinsichtlich flüchtiger Amine gibt es immer wieder den Hinweis in der Literatur, dass diese ebenfalls einen Einfluss auf die sensorische Wahrnehmung von Wein hätten [Torrea und Ancín 2002]. Zurückzuführen ist diese Feststellung auf die Aussagen von Lethonen (1996), der den sensorischen Beitrag biogener Amine mit der Eigenschaft erklärt, im Wein aufgrund des sauren pH-Wertes als geruchslose Salze vorzuliegen, im Mundraum jedoch durch die pH-Wertänderung flüchtig zu werden und somit retronasal geruchswirksam zu werden. Diese Aussage wird aber von keiner sensorischen Untersuchung untermauert. Bislang fehlen eindeutige Hinweise in der Literatur, die einen Einfluss biogener Amine auf die sensorische Wahrnehmung von Wein belegen.