

Diplomarbeit

Biogene Amine im steirischen Wein:

Charakterisierung des Konzentrationsprofils im Jahrgang 2003
und deren Entstehung während der Vinifizierung

Gertrude Rainer

2004/2005



Abstract

The aim of the present work was to get an overview of the concentrations of biogenic amines in mostly Styrian white wines and to follow their formation during the fermentation period by different malolactic fermentation experiments. A published method was optimized for analyzing the amines by using a precolumn derivatization with dansyl chloride. The derivatives were separated on a RP-Phase column. Histamine, putrescine, tyramine, cadaverine and β -phenylethylamine are the most frequent amines in wine. Additional to those five amines ethanolamine, spermidine, spermine and tryptamine were analyzed.

The analysis of the wine samples that were produced by using malolactic fermentation with a following storage period in barrels made of wood, showed physiologically relevant concentrations of histamine. Histamine is the most toxic amine and was determined in concentrations up to 25 mg/L. All the other biogenic amines and polyamines respectively were detected in concentrations much lower than histamine. Only seven of fifty nine samples indicated a putrescine concentration higher than 10 mg/L.

Amines in wine are mainly formed by decarboxylation of the corresponding amino acid by microorganisms during the malolactic fermentation. In fact of that, the changes of amino acid and amine composition in the fermentation experiment were investigated during the process of alcoholic and malolactic fermentation. The data of this experiments point out that the formation of BA already starts during the alcoholic fermentation and not exclusively in the malolactic fermentation. None of the experimental fermentations showed concentrations of histamine higher than 7 mg/L. Probably, higher amounts of histamine are formed during storage. The results of wine samples support this theory, because a malolactic fermentation and a prolonged storage in Barrique increase the amount of histamine significantly. All other amines did not show such a correlation.

The composition of amino acid in grape most decreases during the alcoholic fermentation in consequence of the metabolic activity of yeast and increases after cell lysis. There are enough precursor substances for lactic acid bacteria to form amines in the following malolactic fermentation.

This study shows that biogenic amines are not only formed in red wines but also in white wines.

Zusammenfassung

Ziel dieser Studie ist es, einen Überblick über die Gehalte an biogenen Aminen in großteils steirischen Weißweinen zu gewinnen und deren Bildung in Form von gezielten Gäransätzen zu verfolgen. Dafür wurde eine bereits publizierte Methode, zur Trennung der Amine über eine RP-Phase Säule nach Derivatisierung mit Dansylchlorid, optimiert. Im Mittelpunkt des Interesses standen die im Wein am häufigsten vorkommenden Amine Histamin, Putrescin, Tyramin, Cadaverin und β -Phenylethylamin. Zusätzlich wurden die Konzentrationen von Ethanolamin, Tryptamin, Spermidin und Spermin bestimmt.

Die Analyse der Proben ergab vor allem für Weine, die durch einen biologischen Säureabbau und eine anschließende Lagerung im Holzfass hergestellt wurden, gesundheitlich bedenkliche Gehalte an Histamin. Histamin ist das physiologisch aktivste Amin und konnte in Konzentrationen bis zu 25 mg/L detektiert werden. Alle anderen biogenen Amine bzw. Polyamine waren in wesentlich niedrigeren Konzentrationen vertreten. In sieben der insgesamt 59 untersuchten Weinproben konnten Putrescingehalte über 10 mg/L detektiert werden.

Amine im Wein entstehen durch mikrobielle Decarboxylierung von Aminosäuren hauptsächlich im Verlauf des biologischen Säureabbaus. Daher wurde die Veränderung der Aminosäure- und Aminzusammensetzung, unterschiedlicher Varianten des BSA, über die Gärdauer verfolgt. Aus diesen Ergebnissen ist erkennbar, dass biogene Amine nicht nur im Zuge des biologischen Säureabbaus entstehen, sondern auch bereits während der Hauptgärung. In keiner der Versuchsvarianten konnten aber Histaminkonzentrationen über 7 mg/L detektiert werden. Dies legt nahe, dass die Bildung von Histamin in hohen Konzentrationen erst während der Lagerung erfolgt. Dieser Zusammenhang konnte durch die Ergebnisse der Weinanalysen bestätigt werden. Der biologische Säureabbau und die Lagerung in Holzfässern für 8 – 12 Monate führen zu signifikant höheren Werten an Histamin. Für alle weiteren untersuchten Amine konnte diese Korrelation nicht hergestellt werden.

Die Aminosäurezusammensetzung des Traubenmostes verändert sich im Zuge der Gärung. Während der Hauptgärung kommt es durch Stoffwechselaktivitäten der Hefe zum Verbrauch der Aminosäuren, wobei die Konzentration durch die Autolyse der Zellen am Ende wieder ansteigt. Die Konzentrationen an Vorstufen Substanzen sind ausreichend um größere Mengen an Aminen zu bilden.

Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, dass eine Anreicherung an Aminen nicht nur in Rotweinen, sondern auch in Weißweinen, stattfindet.

Inhaltsverzeichnis

1. Problemstellung.....	6
2. Literaturübersicht	7
2.1 Allgemeines.....	7
2.2 Histamin [2-(4-Imidazolyl)-ethylamin, 1H-Imidazol-4-ethanamin].....	9
2.2.1 Bildung und chemische Daten.....	9
2.2.2 Allgemeines und Wirkung	9
2.2.3 Histaminabbau.....	10
2.2.4 Histaminintoleranz	13
2.3 Tyramin [4-(2-Aminoethyl)-phenol].....	14
2.3.1 Bildung und chemische Daten.....	14
2.3.2 Allgemeines und Wirkung	14
2.4 Tryptamin [2-(Indol-3-yl)-ethylamin, 3-(2-Aminoethyl)-indol].....	15
2.4.1 Bildung und chemische Daten.....	15
2.4.2 Allgemeines und Wirkung	15
2.5 β -Phenylethylamin	16
2.5.1 Bildung und chemische Daten.....	16
2.5.2 Allgemeines und Wirkung	16
2.6 Ethanolamin [2-Aminoethanol].....	17
2.6.1 Bildung und chemische Daten.....	17
2.6.2 Allgemeines und Wirkung	17
2.7 Abbau der Monoamine.....	18
2.8 Polyamine.....	18
2.8.1 Bildung und chemische Daten.....	19
2.8.2 Allgemeines und Wirkung	20
2.9 Bildung biogener Amine	24
2.9.1 Decarboxylierungsreaktion	24
2.9.2 Einfluss der Mikroflora des Weins auf die Bildung der biogenen Amine	25
2.10 Weinbau	28
2.10.1 Ursprünge des Weinbaus.....	28
2.10.2 Weißweinerstellung.....	29
3. Methoden zur Analyse der Proben	31
3.1 Geräteparameter	32
3.2 Probenvorbereitung	33

3.3 Chromatogramme der Standardgemische	34
3.4 Quantifizierungsmethoden	35
4. Validierung.....	36
4.1 Wiederfindung.....	37
4.2 Methodenpräzision	39
5. Probenbeschreibung	40
5.1 Weinproben	40
5.1.2 Charakterisierung des Weinbaujahres 2003	40
5.1.3 Probenliste.....	41
5.2 BSA-Versuch	43
5.2.1 Probenliste der Versuchsvarianten	44
6. Auswertung der Ergebnisse.....	45
6.1 Ergebnisse der Weinproben	45
6.2 Ergebnisse des BSA-Versuchs	56
7. Diskussion	65
8. Literaturverzeichnis.....	74
9. Anhang	77
9.1 Abkürzungsverzeichnis	77

1. Problemstellung

Lebensmittel sind nicht nur eine elementare Quelle für Nährstoffe, sondern können auch chemische Substanzen mit toxischen Eigenschaften enthalten. Die Kontamination kann auf einem direkten oder indirekten Weg erfolgen. Eine direkte Kontamination besteht, wenn toxische Substanzen bereits im Rohmaterial vorhanden sind. Im Gegensatz dazu erfolgt die indirekte Kontamination während der Produktion, Transport oder Lagerung.

Biogene Amine (BA) kommen bereits im Rohmaterial vor, da sie wichtige regulatorische Funktionen in Zellen ausüben. Sie können während der mikrobiellen Prozessierung ein physiologisch bedenkliches Potential erreichen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Gehalte an biogenen Aminen in steirischen Weißweinen des Jahrgangs 2003 zu bestimmen. Die besonderen klimatischen Bedingungen im Jahr 2003 führten zu mikrobiologischen Problemen in der Weinherstellung und daher werden in diesen Weinen erhöhte Gehalte an biogenen Aminen erwartet.

Um die Bildung der Amine im Verlauf der Vinifizierung zu charakterisieren, wird deren Entstehung während der Hauptgärung bzw. des anschließenden biologischen Säureabbaus in gezielten Gäransätzen verfolgt. Gleichzeitig werden in diesen Proben auch die Aminosäuregehalte detektiert, da freie Aminosäuren die Ausgangssubstanz für biogene Amine sind.

Der Grossteil der bereits durchgeführten Studien über biogene Amine in Weinen konzentrierte sich auf Rotweine, da diese aufgrund ihrer Prozessierung durch besonders hohe Histamingehalte gekennzeichnet waren. Histamin ist das physiologisch wichtigste biogene Amin aufgrund seiner Wirkung als Mediator bei allergischen Reaktionen im Körper [1].

Die Steiermark ist ein traditionelles Weißweinland mit qualitativ hochwertigen Lagenweinen. Diese Qualitätsweine werden so wie Rotweine einem biologischen Säureabbau unterzogen und häufig anschließend in Holzfässern zur Reifung gelagert. Durch diese, dem Rotwein sehr ähnliche Prozessierung, sind auch im Weißwein erhöhte Konzentrationen an biogenen Aminen zu erwarten.

Da die Anzahl der Personen, welche Intoleranzsymptome gegenüber Histamin zeigen zunimmt, ist eine gesetzliche Regelung der erlaubten Höchstkonzentration in Diskussion.

Diese Studie soll den Weinproduzenten einen Überblick über die Gehalte an BA in ihren Weinen verschaffen, um eventuell notwendige Maßnahmen zu deren Reduktion treffen zu können.

2. Literaturübersicht

2.1 Allgemeines

Biogene Amine sind niedermolekulare organische Basen und besitzen biologische Aktivität. Sie entstehen bei normalen metabolischen Aktivitäten aller lebenden Zellen und werden durch die Decarboxylierung der entsprechenden Aminosäure gebildet. Einige biogene Amine wie Serotonin, Histamin und Tyramin erfüllen wichtige physiologische Funktionen im menschlichen und tierischen Organismus. In Pflanzen sind vor allem Putrescin, Spermidin und Spermin in physiologische Prozesse wie Zellteilung, Blüte und Fruchtentwicklung involviert [2].

Als „biogene Amine“ werden nach *Seiler et al.* [3] die Decarboxylierungsprodukte Histamin, Serotonin, Tyramin, Phenylethylamin, Tryptamin, aber auch Putrescin, Cadaverin und Agmatin definiert. Die beiden Polyamine Spermidin und Spermin gehören zur Gruppe der natürlichen Polyamine.

Die Einteilung der Amine kann aber auch auf Basis ihrer chemischen Struktur erfolgen [4].

Tabelle 1: Einteilung der biogenen Amine:

Monoamine	Diamine	Polyamine
Tyramin	Histamin	Spermidin
Phenylethylamin	Tryptamin	Spermin
Ethanolamin	Putrescin	
	Cadaverin	

In der obigen Tabelle wurden nur für diese Arbeit relevante Amine angeführt.

Biogene Amine sind normale Bestandteile vieler Nahrungsmittel wie Käse, Wein, Bier, Sauerkraut, Fischprodukten und Salami [5].

Die Gegenwart von biogenen Aminen in Wein ist gut dokumentiert und variiert je nach Weintyp. Es gibt zwei Quellen für Amine im Wein. Einerseits befinden sich bereits im Rohmaterial selbst biogene Amine und andererseits entstehen sie durch den Gärungsprozess [6].

Die unterschiedlichen Gehalte an biogenen Aminen in Weinen ergeben sich durch unterschiedliche Prozessführung, Lagerungszeit und -bedingungen sowie durch eine eventuelle mikrobiologische Kontamination während des Herstellungsprozesses.

Einige der dabei entstehenden Amine, vor allem aromatische, haben vasoaktive und psychoaktive Eigenschaften und können gegebenenfalls gesundheitsschädliche Folgen mit sich bringen [7].

Grundsätzlich stellen biogene Amine kein Gesundheitsrisiko dar, sofern sie nicht in zu hohen Mengen konsumiert werden und der natürliche Mechanismus für den Abbau nicht inhibiert ist, oder genetische Defekte vorhanden sind.

Die häufigste Lebensmittelunverträglichkeit, die von biogenen Aminen ausgeht, bezieht sich auf das Histamin. Es ist jedoch nicht das einzige Amin, welches für empfindliche Personen schädlich ist, da einige Amine synergetische Effekte besitzen [2].

Unter der Berücksichtigung der GMP-Regeln (Good Manufacturing Practice) werden Bereiche von 50 – 100 mg/kg für Histamin, 100 – 800 mg/kg für Tyramin und 30 mg/kg für β -Phenylethylamin, bzw. eine Gesamtmenge von 100 – 200 mg/kg toleriert.

Einige Länder haben die maximalen Mengen für einzelne Produkte geregelt. In der Schweiz liegt der Grenzwert für Histamin in Wein bei 10 mg/L und in den USA gelten 50 mg Histamin in 100 g Fisch als ein Gesundheitsrisiko. Die Europäische Union führte einen gesetzlichen Grenzwert für Histamin in Fisch (91/493/EEC) ein, welcher bei 100 mg/kg liegt. Die Summe der vasoaktiven Amine (Histamin, Tyramin, Tryptophan, β -Phenylethylamin) sollte 200 mg/kg nicht überschreiten [17].

P. Lehtonen publizierte, dass für Österreich 10 mg/L, Belgien 5 - 6 mg/L, Frankreich 8 mg/L, Deutschland 2 mg/L, Holland 3,5 mg/L und Schweiz 10 mg/L als Höchstgrenze für Histamin im Wein empfohlen werden. Einen gesetzlichen Grenzwert für Histamin im Wein gibt es weder in Österreich noch in der EU [26].

2.2 Histamin [2-(4-Imidazolyl)-ethylamin, 1H-Imidazol-4-ethanamin]

2.2.1 Bildung und chemische Daten

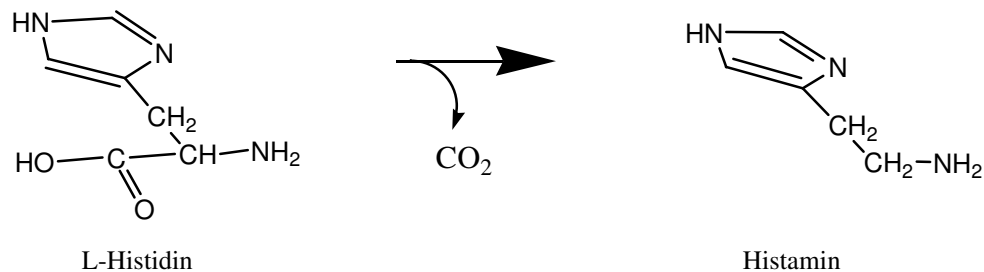


Abb.1: Decarboxylierung des L-Histidins zum Histamin

Histamin gehört zur Gruppe der von aromatischen Aminosäuren abgeleiteten biogenen Amine und besitzt ein Molekulargewicht von 111,15 g/mol. Es bildet farblose Kristalle welche bei 84 °C schmelzen und erreicht den Siedepunkt bei 210 °C (24 mbar). Die Kristalle lassen sich leicht in Wasser und Ethanol lösen, sind in Ether jedoch unlöslich [9].

2.2.2 Allgemeines und Wirkung

Nicht lange nachdem *Windaus* und *Vogt* [10] im Jahr 1906 erstmals die Synthese von Histamin beschrieben, gelang *Barger* und *Dale* die Isolierung dieses biogenen Amins aus *Secale cornutum*. Im gleichen Jahr konnte *Ackermann* nachweisen, dass Histamin ein Abbauprodukt der Aminosäure L-Histidin darstellt. In der Folgezeit erkannten *Dale* und *Laidlaw* das vielfältige pharmakologische Potential dieser Substanz.

Dieses biogene Amin ist in der Natur ubiquitär verbreitet. Im Säugetierorganismus ist Histamin in beinahe allen Geweben nachzuweisen; Variationen des Histamin-Gehaltes sind nicht nur abhängig vom Gewebe, sondern auch von der Spezies [10].

Histamin ist als einer der wichtigsten interzellulär wirkenden Mediatoren an vielen hochspezifischen Reaktionen der verschiedensten Zellen beteiligt. Es wird in den Granula von Mastzellen und basophilen Zellen des Blutes gespeichert und erst bei Bedarf freigesetzt. Histamin gehört zu den Gewebshormonen die von endokrin aktiven Zellen synthetisiert werden. Die Synthese des Histamins läuft über die Decarboxylierung der Aminosäure Histidin, welches eine wichtige Rolle beim Transport von resorbiertem Kupfer über das Blut

in die Leber spielt. Das mit der Nahrung aufgenommene Histidin wird auch im Dickdarm durch die intestinale Darmflora decarboxyliert [11].

Histamin wird also auch im menschlichen Körper aktiv gebildet und ist an der Regulation verschiedener Körperfunktionen, wie Magensaftsekretion, Zellwachstum und Zelldifferenzierung beteiligt. Es spielt insbesondere beim Auftreten allergischer Reaktionen eine zentrale Rolle [1].

Die basophilen Granulozyten tragen an ihrer Oberfläche IgE-spezifische Rezeptoren, an die sich IgE-Antikörper heften (z.B. bei Heuschnupfen), die sich wiederum bei Exposition zu Pollen – mit den Antigenen verbinden. Durch die Bildung dieses Immunkomplexes an der Basophilenoberfläche wird Histamin aus den Granula sezerniert, und es kommt zu allergischen Symptomen wie Rötung, Juckreiz, Nesselausschlag, Schleimhautschwellung, Atembeschwerden und Blutdruckabfall [12]. Diese allergischen Symptome entstehen durch die rasche Bindung des freiwerdenden Histamins an spezielle Rezeptoren (Histaminrezeptoren vom Typ 1 bzw. 2), was in der Folge eine Kontraktion der glatten Muskulatur (Darm, Lunge, Uterus) sowie eine Erweiterung der Blutgefäße und ein Ausströmen von Blutplasma in das umliegende Gewebe bedingt.

Gelangt jetzt Histamin auch von außen, etwa über die Nahrung in den Körper, so können unter bestimmten Bedingungen ebenfalls allergieähnliche Symptome ausgelöst werden.

Histamin ist auch in vielen Tiergiften enthalten wie z.B. im Gift der Biene oder im Nesselgift der Brennnessel.

2.2.3 Histaminabbau

Histamin an sich ist im Grunde nicht gefährlich, sondern für den Organismus lebenswichtig, aber sobald entsprechende Abbaumechanismen fehlen kommt es zu Intoleranzreaktionen. Die Diaminoxidase (DAO) ist das wichtigste histaminabbauende Enzym und wird vor allem in den Zellen der Dünndarmmucosa (Enterozyten) gebildet. Sie baut sowohl durch Nahrung aufgenommenes als auch von Darmbakterien gebildetes Histamin ab [11]. Die Diaminoxidase ist hauptsächlich im Dünndarm, in der Leber, in den Nieren und im Blut in weißen Blutzellen zu finden. Bei Schwangeren wird die DAO zusätzlich in der Plazenta gebildet. Schwangere haben etwa 500 – 1000 mal höhere Blutdiaminoxidasespiegel als Nicht-Schwangere. Der Zweck dieser Maßnahme besteht darin, den Uterus, der Histamin-sensibel ist, zu schützen. Durch diese Überproduktion wird sichergestellt, dass der Fötus nicht in Folge von Muskelkontraktionen, ausgelöst durch einen zu hohen Histaminspiegel, vorzeitig abgeht.

Bei gesunden Menschen wird das Histamin aus der Nahrung bereits im Darm abgebaut, das verbleibende wird beim Durchtritt durch die Darmschleimhaut von der dort sitzenden Diaminoxidase abgebaut [1].

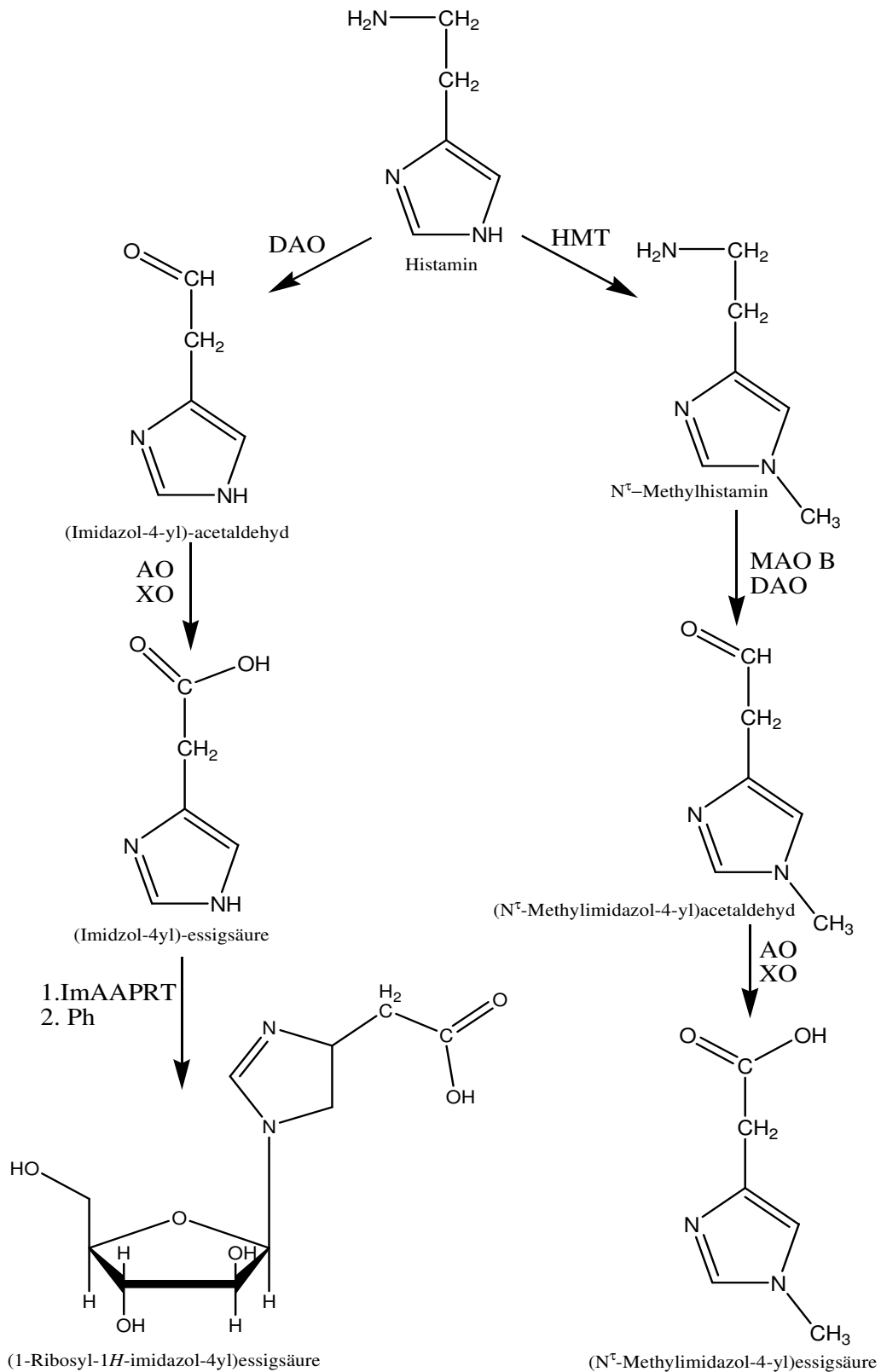
Der erste Metabolisierungsschritt führt zu (Imidazol-4-yl)acetaldehyd. Dieses Intermediat wird schnell durch eine Aldehydoxidase oder Xanthinoxidase zu (Imidazol-4-yl)essigsäure oxidiert. Im letzten Schritt wird der N^{ϵ} -Stickstoff durch die Imidazolessigsäurephosphoribosyltransferase und eine Phosphatase ribosyliert. Die entstehende (1-Ribosyl-1*H*-imidazol-4-yl)essigsäure sowie die übrigen Abbauprodukte werden im Urin ausgeschieden (siehe Abb.2) [10].

Die Cofaktoren der Diaminoxidase sind 6-Hydroxydopa und Pyridoxalphosphat, Vitamin B₆. Im klassischen Fall findet man deshalb bei Histamin-intoleranten Patienten neben erhöhten Histaminwerten und erniedrigter DAO zusätzlich niedrige Vitamin B₆-Spiegel.

Diaminoxidase ist ein empfindliches Enzym das von verschiedenen Substanzen wie anderen biogenen Aminen, Alkohol und seinem Abbauprodukt Acetaldehyd und verschiedenen Medikamenten gehemmt werden kann.

Das Enzym welches den Abbau des Alkohols bewirkt – die Alkoholdehydrogenase (ADH) – konkurriert mit anderen Enzymen um den Sauerstoff. Bei gleichzeitiger Aufnahme von Alkohol und biogener Amine genießt der Alkoholabbau höhere Priorität und das Histamin kann sich im Körper anreichern. Die toxische Wirkung des Alkohols kann daher durch biogene Amine, vor allem durch Histamin, verstärkt werden. [11]

Der zweite Metabolisierungsweg erfolgt über das hochselektive Enzym Histamin- N^{ϵ} -Methyltransferase. Es baut beim Menschen das Histamin im Zentralnervensystem und im geringen Ausmaß auch in der Peripherie ab. Als Cofaktor für diese Methylierungsreaktion dient S-Adenosyl-L-Methionin (SAM). Durch die Methylierung verliert Histamin seine Affinität zu seinen Rezeptoren. Im nächsten Schritt erfolgt eine oxidative Desaminierung des N^{ϵ} -Methylhistamins durch eine Monoaminoxidase Typ B oder eine Diaminoxidase. Der entstandene (N^{ϵ} -Methylimidazol-4-yl)acetaldehyd wird anschließend durch eine Aldehydoxidase oder eine Xanthinoxidase zu (N^{ϵ} -Methylimidazol-4-yl)essigsäure oxidiert (siehe Abb.2) [10].



HMT= Histamin-*N*^ε-Methyltransferase; MAO B= Monoaminoxidase B; DAO= Diaminoxidase;
 AO= Aldehydoxidase; XO= Xanthinoxidase; ImAAPRT= Imidazolessigsäurephosphoribosyltransferase;
 Ph= Phosphatase

Abb.2: Metabolisierungswege des Histamins

2.2.4 Histaminintoleranz

Histaminintoleranzreaktionen sind keine echten allergischen Reaktionen, da sie nicht IgE-vermittelt sind. Die Ursache für Histaminintoleranz – also die Unverträglichkeit durch Nahrung aufgenommenes Histamin – ist ein absoluter Mangel des histaminabbauenden Enzyms DAO oder ein relatives Missverhältnis zwischen der DAO und Histamin. Die abbauende Wirkung der DAO beschränkt sich nicht nur auf Histamin. Auch andere biogene Amine wie Putrescin, Cadaverin, Spermin und Spermidin werden von der DAO metabolisiert. Wenn eine Speise größere Mengen dieser biogenen Amine enthält, kann das dazu führen, dass die DAO durch die Anwesenheit der anderen BA gehemmt wird und dann für den Abbau von Histamin nicht mehr in ausreichender Menge vorhanden ist.

Symptome der Histamin-Intoleranz sind häufig Kopfschmerzen bis Migräne, verstopfte oder rinnende Nase, Atemwegsbeschwerden bis zum Asthma bronchiale, Herzrhythmusstörungen, chronisch niedriger Blutdruck, Müdigkeit und Erschöpfung, Magen- und Darmbeschwerden Juckreiz und Quaddelbildung der Haut.

Eine Reduktion der Histaminabbaufähigkeit findet man nicht nur primär als isolierte Erkrankung, sondern auch sekundär erworben als Folge anderer Erkrankungsprozesse z.B. von gastrointestinalen Allergien und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa [11].

Personen mit einer so genannten Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergie, d.h. eine Birkenpollenallergie bei gleichzeitiger Unverträglichkeit von Äpfeln, Nüssen und Karotten, haben statistisch gesehen ein erhöhtes Risiko gleichzeitig Histamin-Intolerant zu sein.

Weiters gibt es noch „Histamin-Releaser“, dies sind Speisen die von sich aus spontan Histamin im Körper freisetzen können. Dazu gehören Erdbeeren, Zitrusfrüchte und Schalentiere.

Durchgeführte Studien einer Prämedikation mit einem Antihistaminikum (H1-Rezeptorenblocker) konnten zeigen, dass Patienten mit einer Histaminintoleranz histaminhaltige Lebensmittel vertragen, ohne in den folgenden Stunden mit klinischer Symptomatik rechnen zu müssen [1].

2.3 Tyramin [4-(2-Aminoethyl)-phenol]

2.3.1 Bildung und chemische Daten

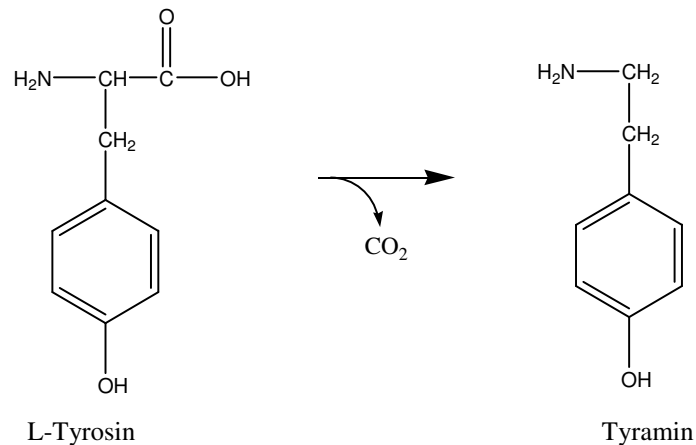


Abb.3: Bildung des Tyramin aus L-Tyrosin durch Tyrosindecarboxylase

Tyramin, mit einem Molekulargewicht von 137,18 g/mol, bildet farblose, süßlich riechende, bitter schmeckende Blättchen oder Nadeln. Der Schmelzpunkt liegt bei 161 °C, der Siedepunkt bei 210 °C (75 mbar). Es ist leicht löslich in siedendem Alkohol und wenig löslich in kaltem Wasser, Benzol, Ether, Chloroform und Xylol [9].

2.3.2 Allgemeines und Wirkung

Tyramin gehört zur Gruppe der vasoaktiven Amine weil es eine Erhöhung des Blutdruckes bewirken kann. Es agiert hauptsächlich indirekt durch Freisetzung von Noradrenalin aus den Nervenenden des Sympatikus, was zum Anstieg des Blutdruckes führt. Tyramin erweitert auch die Pupillen, verursacht Speichelfluss und steigert die Atmung und den Blutzucker. Es kann bei empfindlichen Personen auch Migräne auslösend wirken.

Das Reaktionsprodukt von Tyramin und Nitrit, 3-Diazotyramin, ist ein Kanzerogen. Diese mutagene Substanz kann sich im Magen durch Inkubation von Tyramin und Nitrit, bei 37 °C, pH 1 – 2 und einer Zeit von 60 Minuten, in signifikanten Mengen bilden [17].

2.4 Tryptamin [2-(Indol-3-yl)-ethylamin, 3-(2-Aminoethyl)-indol]

2.4.1 Bildung und chemische Daten

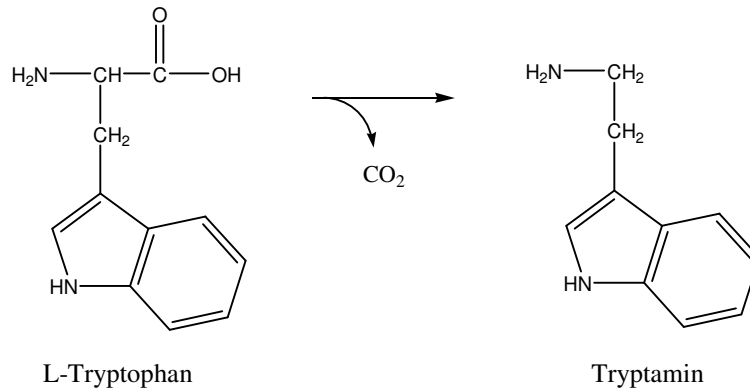


Abb.4: Decarboxylierung des L-Tryptophans zum Tryptamin

Tryptophan (MG: 160,22 g/mol) ist kristallin und farblos und schmilzt bei 118 – 120 °C. Es ist in Alkohol und Aceton löslich, aber in Wasser, Ether, Benzol und Chloroform unlöslich. [9]

2.4.2 Allgemeines und Wirkung

Tryptamin stimuliert die Kontraktion der glatten Muskulatur, wie Blutgefäße und Uterus und gehört ebenfalls zur Gruppe der vasoaktiven Amine da es den Blutdruck erhöht. Es kommt als bakterielles Abbauprodukt, sowie auch in tierischen und pflanzlichen Geweben vor, wobei es bei Pflanzen wachstumsfördernd wirkt.

Natürlich vorkommende Tryptamin-Derivate sind Serotonin, Melatonin, die halluzinogen wirkenden Indol-Alkaloide Psilocybin und Bufotenin [9].

2.5 β -Phenylethylamin

2.5.1 Bildung und chemische Daten

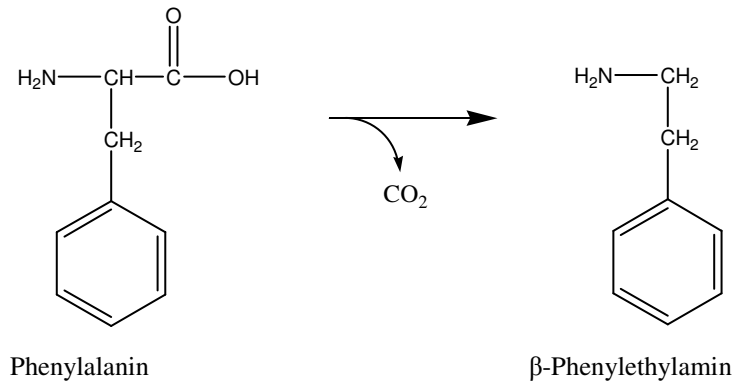


Abb.5: Entstehung von β -Phenylethylamin durch Decarboxylierung von Phenylalanin

β -Phenylethylamin besitzt ein Molekulargewicht von 121,18 g/mol und ist eine farblose Flüssigkeit die CO_2 aus der Luft absorbiert. Es lässt sich in Wasser, Alkohol und Ether lösen [9].

2.5.2 Allgemeines und Wirkung

Wie Histamin, Tyramin und Tryptamin gehört auch β -Phenylethylamin zu den vasoaktiven, Blutdruck erhöhenden, Aminen. Es kann bei empfindlichen Personen Kopfschmerzen oder einen Migräneanfall hervorrufen [18].

Neben Tyramin und Serotonin agiert auch β -Phenylethylamin als Stimulans für das zentrale Nervensystem. β -Phenylethylamin kann den Endorphinspiegel erhöhen und wirkt als natürliches Antidepressivum.

2.6 Ethanolamin [2-Aminoethanol]

2.6.1 Bildung und chemische Daten

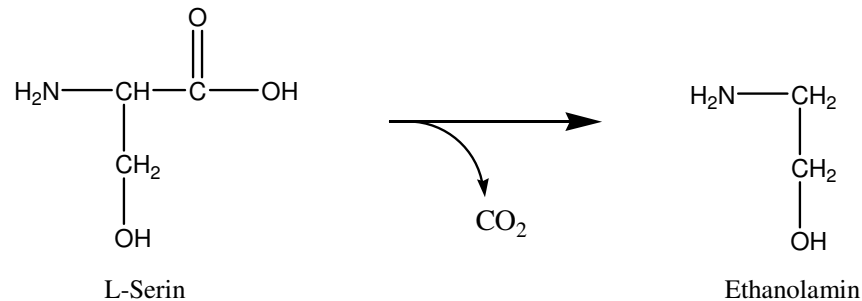


Abb.6: Decarboxylierung des Serin zum Ethanolamin

2-Aminoethanol ist eine farblose, ölige, stark alkalisch reagierende, Ammoniak ähnlich riechende Haut und Schleimhaut reizende hygroskopische Flüssigkeit. Es ist mit Wasser und Alkohol mischbar und siedet in reiner Form bei einer Temperatur von 171 °C [9].

2.6.2 Allgemeines und Wirkung

Die Entstehung von Ethanolamin beschränkt sich nicht nur auf Decarboxylierung von Serin, sondern es wird auch durch Spaltung von Phosphatiden gebildet. In höheren Pflanzen kommt es auch in freier Form vor.

Es ist ein wesentlicher Baustein des Membranbestandteils Phosphatidylethanolamin und bildet auch eine Vorstufe für Hormone und Neurotransmitter.

Acetylcholin entsteht durch Acetylierung von Ethanolamin mit Acetyl-CoA und dreifacher Methylierung. Acetylcholin ist ein Neurotransmitter in den Nervenreizleitungsbahnen des ZNS und der peripheren Nervenbahnen. Es steuert die Muskelkontraktion durch Aktivierung der motorischen Endplatte der Muskelzellen in Folge der Bindung an acetylcholinerge Rezeptoren [19].

2.7 Abbau der Monoamine

Der Abbau von Tyramin, Tryptophan, β -Phenylethylamin und Etanolamin erfolgt mit Hilfe der Monoaminoxidase (MAO). Dieses Cu^{2+} -hältige Flavoenzym ist in den Mitochondrien von Nervenzellen, extrazellulär in Gehirn, Leber, Niere und Verdauungstrakt lokalisiert und tritt als Isoenzym auf.

Amine werden zunächst zu Iminen dehydriert, wobei der freiwerdende Wasserstoff auf Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid übertragen wird. In der Folge wird die Hydrolyse des Imins zum Aldehyd und Ammoniak katalysiert.



Abb.7: Abbaureaktion der Monoamine durch Monoaminoxidase

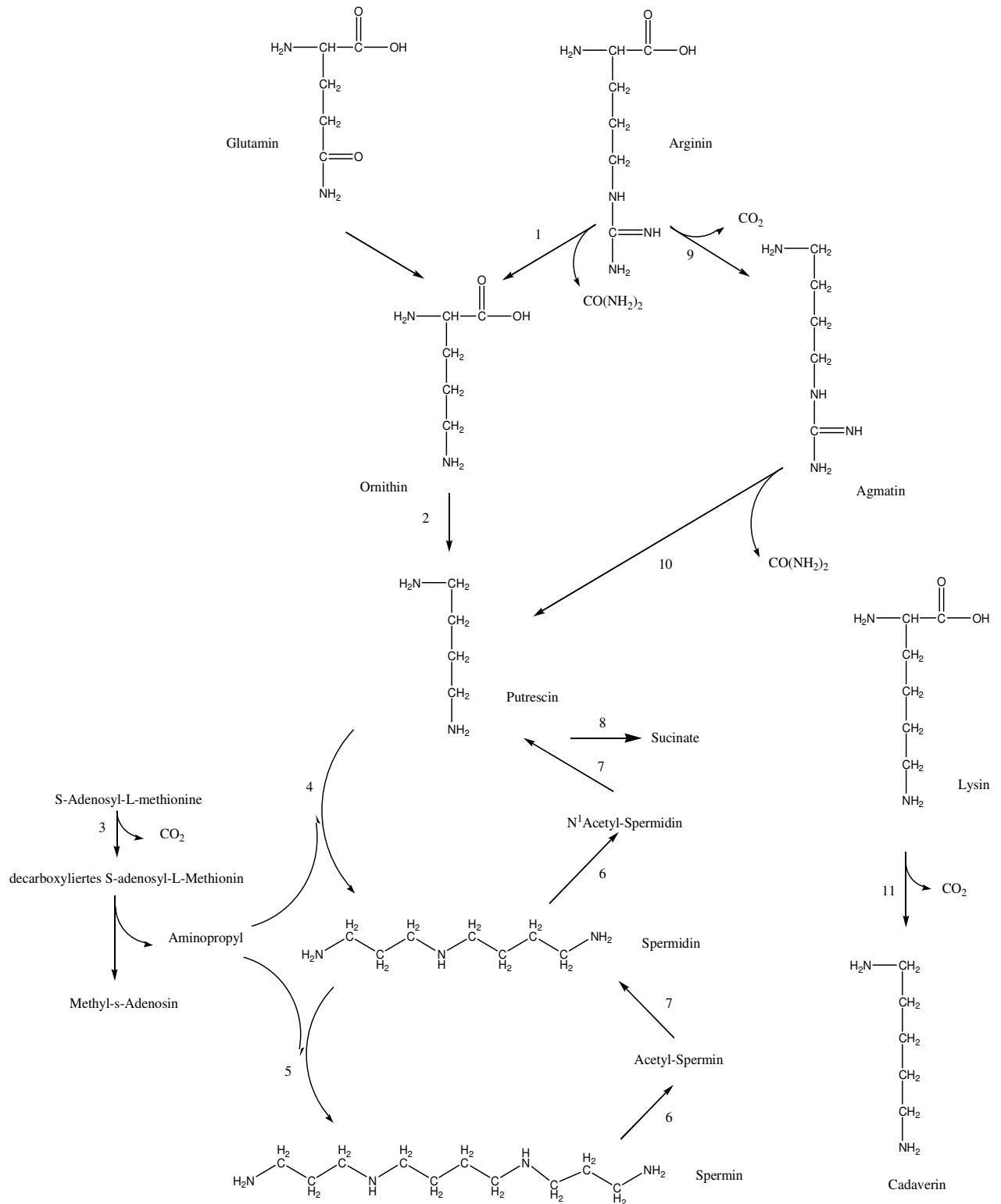
Diese Reaktion ist für die ständige Regulation der Aminkonzentration maßgebend und damit für verschiedene physiologische Prozesse wichtig, an denen Amine teilnehmen, wie z.B. für die Funktion des Nervensystems aufgrund von Neurotransmittern.

MAO-Hemmstoffe wie Psychopharmaka führen durch Blockierung der Monoaminoxidase zu einer vorwiegend zentralnervösen Anreicherung von Neurotransmittern, was allmählich eine allgemeine Aktivierung bei bestimmten Depressionstypen zur Folge hat. Bei der Therapie mit MAO-Hemmern kann sich der Genuss aminreicher Nahrungsmittel störend auswirken da sich Monoamine im Körper anreichern und die unerwünschten Symptome auslösen können [9].

2.8 Polyamine

<i>Cadaverin</i>	(1,5-Diaminopentan),
<i>Putrescin</i>	(1,4-Diaminobutan),
<i>Spermin</i>	([N,N'-Bis-(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin],
<i>Spermidin</i>	([N-(3-Aminopropyl)-1,4-butandiamin])

2.8.1 Bildung und chemische Daten



1= Arginase; 2= Ornithin Decarboxylase; 3=S-Adenosyl-L-Methionin Decarboxylase; 4= Spermidinsynthase; 5= Sperminsynthase; 6= Spermidin/Spermin N¹-Acetyltransferase; 7=Polyaminoxidase; 8=Diaminoxidase; 9=Arginin Decarboxylase; 10= Agmatinase; 11= Lysin Decarboxylase

Abb.8: Synthese und Metabolismus von Polyaminen [3]

Cadaverin (MG 102,18), eine sirupöse, rauchende, unangenehm riechende Flüssigkeit, schmilzt bei 9 °C und hat den Siedepunkt bei 178 – 180 °C. Es ist in Wasser und Alkohol leicht, in Ether kaum löslich.

Putrescin besitzt ein Molekulargewicht von 88,15 g/mol und ist eine übel riechende, ätzende, brennbare, farblose in Wasser lösliche Flüssigkeit bzw. Kristalle. Der Schmelzpunkt liegt bei 27 °C und es siedet bei 160 °C.

Spermidin (MG: 145,25) ist ein farbloses Öl und hat einen Siedepunkt von 128 – 130 °C (14 Torr). Als Trihydrochlorid bildet es farblose Kristalle, die ihren Schmelzpunkt bei 256 – 258°C haben und in Wasser und Ethanol löslich, jedoch unlöslich in Ether und Benzol, sind.

Spermin, mit einem Molekulargewicht von 202,34 g/mol bildet hygroskopische Kristalle die bei 55 – 60 °C schmelzen. Der Siedepunkt liegt bei 141 - 142°C (0,5Torr). Es ist in Wasser, Ethanol löslich, unlöslich in Benzol und Ether. Spermin absorbiert Kohlendioxid aus der Luft [9].

2.8.2 Allgemeines und Wirkung

Der Name Putrescin leitet sich vom lateinischen ab und bedeutet übersetzt verfaulen. Es wurde 1883 erstmals zusammen mit Cadaverin (von lat: cadaver = Leiche) von Brieger in faulenden Eiweißstoffen gefunden und als Ptomaine oder so genannte Leichengifte bezeichnet.

Spermidin ist der Vorläufer von Spermin und wurde zuerst im menschlichen Sperma entdeckt. Im Sperma ist Spermidin, aber auch Spermin über Phosphatgruppen an die Nukleinsäure gebunden. Spermidin und Spermin kommen jedoch nicht nur im Sperma, sondern auch in allen übrigen Zellen vor [9].

Als Quelle für Polyamine konnten bisher drei Wege definiert werden:

- 1.) *In situ* Biosynthese von Aminosäuren
- 2.) direkte Aufnahme aus der Nahrung
- 3.) Synthese der Bakterien in der Darmflora

Die Aufnahme über die Nahrung stellt die wichtigste Quelle dar, jedoch wird die Bioverfügbarkeit durch einige Faktoren reduziert. Polyamine im Lumen können nicht vollständig absorbiert werden, da es vor und während des Passierens des Darmtraktes zur Umwandlung in polyamine und nicht-polyamine Metabolite kommt oder von Makromolekülen wie Proteine oder Stärke absorbiert werden. Diaminoxidase und Polyaminoxidase sind die wichtigsten Enzyme für die Umwandlung in die entsprechenden

Metabolite. Die Aktivität dieser Enzyme ist der wichtigste Faktor für die Bioverfügbarkeit der Polyamine. Es besteht jedoch ein linearer Zusammenhang zwischen Aufnahme und zugeführter Menge an Polyaminen [15].

Die Polyamine Spermidin und Spermin und ihr Precursor Putrescin sind niedermolekulare organische Kationen und spielen eine essentielle Rolle im Zellwachstum [13]. Sie sind in beinahe allen Schritten der DNA, RNA und Proteinsynthese involviert. Aufgrund ihrer chemischen Struktur sind sie sehr effizient gegen freie Radikale und schützen so Makromoleküle wie DNA und Proteine vor oxidativen Stress und Schäden. Zu den Hauptaufgaben von Polyaminen gehört deren Wirkung als Second Messenger [14].

Im Gegensatz zu Metallionen können Polyamine aufgrund ihrer Länge und Verteilung der positiven Ladung im Molekül, Brücken zu entfernten, negativ geladenen Verbindungen bauen. Sie sind sehr flexible Polykationen und besitzen unter physiologischen Bedingungen zwei, drei oder vier positive Ladungen. Polyamine sind sehr stabile, hitzeresistente Verbindungen und überleben auch saure oder alkalische Bedingungen.

Aufgrund ihrer Struktur erfüllen sie eine Reihe von spezifischen Funktionen in den Zellen wie die Kontrolle und Initiation der Translation der mRNA, Stimulierung der Zusammenlagerung von Ribosomenuntereinheiten und Stabilisierung der tRNA Struktur. Gleichzeitig können sie aber auch den Abbau der RNA reduzieren und die Synthese von RNA und DNA steigern.

Die wichtigste Aufgabe von Polyaminen ist ihre Wirkung als Second Messenger da diese Funktion von keinem anderen positiv geladenen Molekül übernommen werden kann. Dabei vermitteln sie die Aktionen aller bekannten Hormone und Wachstumsfaktoren [4].

Polyamine sind essentielle Faktoren bei der Zellproliferation und Differenzierung, indem sie bei der Induktion von Gewebswachstum eine wichtige Rolle spielen [11].

Der Bedarf an Polyaminen ist vor allem in schnell wachsendem Gewebe sehr hoch. Die Bedeutung der Polyamine im Tumorwachstum ist hingehend bekannt und die Inhibierung der Polyaminbiosynthese als Therapie ein Ziel der Krebsforschung [4].

Ornithin Decarboxylase (ODC) ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese von Polyaminen. Einige Studien haben gezeigt, dass die Konzentrationen von ODC und Polyaminen bei vorhandenen Tumoren erhöht sind. Die steigende Aktivität von ODC und die daraus resultierende erhöhte Produktion von Polyaminen unterstützt das Wachstum maligner Zellen. Die Messung der erhöhten ODC-Aktivität *in vitro* und *in vivo* wird oft als Index für das kanzerogene Potential einer Komponente herangezogen. Aktivatoren der Ornithindecaboxylase wirken als Krebspromotoren [16].

Die Inhibierung der ODC hat einerseits das Potential das Wachstum eines Tumors zu reduzieren und andererseits kann dadurch auch das Risiko einer Tumorentwicklung vermindert werden. Ein Inhibitor für ODC ist DFMO (α -Difluoromethylornithin) da es als Substrat für das Enzym agiert. Enzym und Substrat bilden ein reaktives Intermediat welches kovalent im aktiven Zentrum des Enzyms bindet und es dadurch irreversibel inaktiviert [16].

In Gegenwart von Nitriten und Säure kann Spermidin und möglicherweise auch Spermin Nitrosamine in Lebensmitteln bilden. In fettreichen, wasserhaltigen Nahrungsmitteln kann bei hohen Temperaturen das Kanzerogen N-Nitrosopyrrolidin aus Putrescin oder Spermidin gebildet werden.

Cadaverin und Putrescin werden als nicht humantoxisch betrachtet. Cadaverin kann jedoch die Toxizität von Histamin steigern. In vielen Pflanzen stellt es eine Vorstufe der Alkaloide dar.

Putrescin aktiviert in Säugetieren die S-adenosyl-L-methionin-Decarboxylase-Expression. Cadaverin und auch Putrescin zeigen inhibitorische Effekte gegenüber der Aminopeptidase B und Alanyl-Aminopeptidase [17].

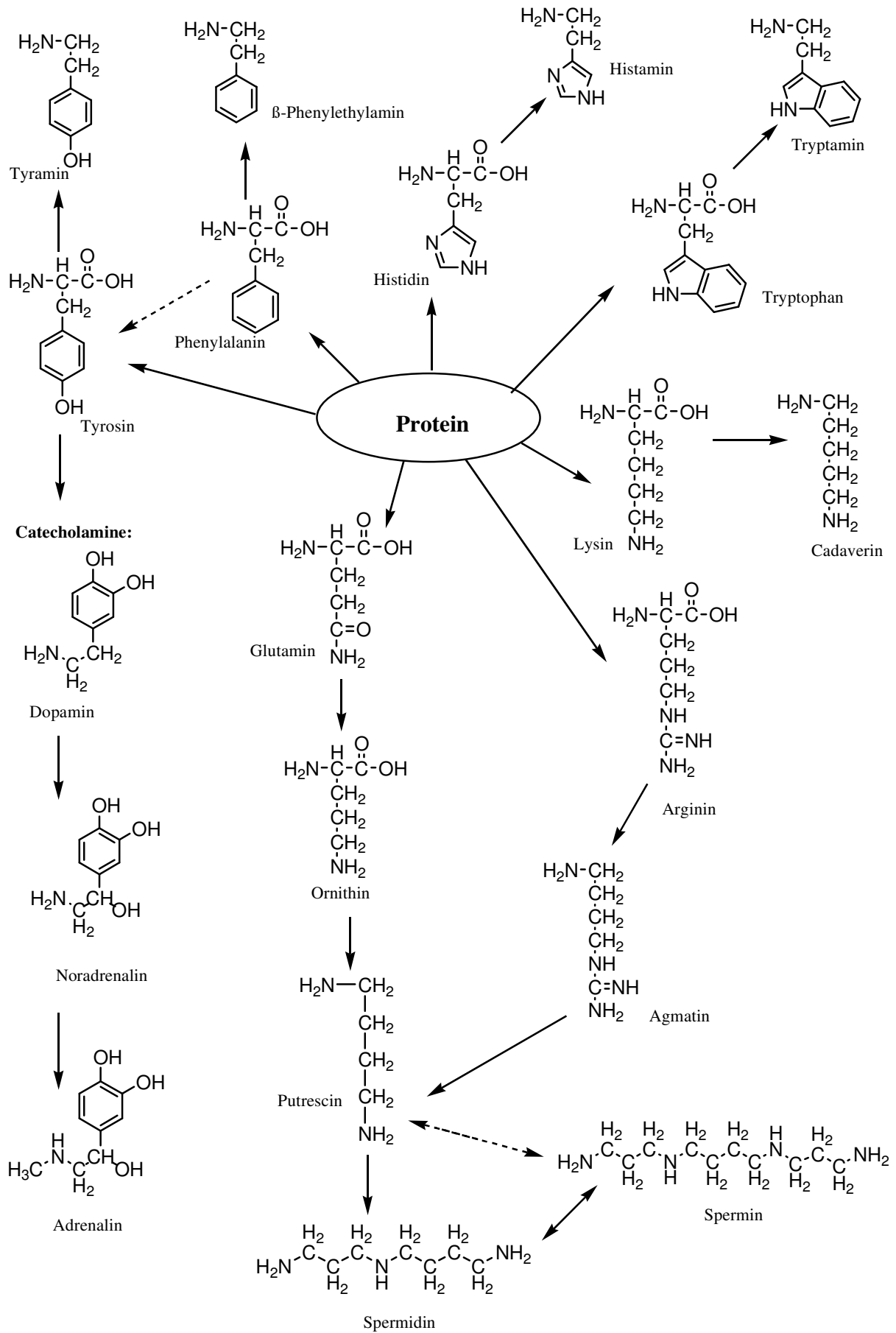


Abb.9: Gesamtübersicht der metabolischen Wege zur Bildung von biogenen Aminen [19]

2.9 Bildung biogener Amine

Es gibt drei unterschiedliche Möglichkeiten der Entstehung biogener Amine:

- 1.) durch hydrolytische Spaltung stickstoffhaltiger Verbindungen
- 2.) Aminierung von Aldehyden und Ketonen
- 3.) Enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren [8]

Die Aminbildung ist eine Folge normaler Stoffwechselaktivität in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen, wobei die enzymatische Decarboxylierung die Hauptquelle darstellt.

Vor allem in fermentierten bzw. gereiften Lebensmitteln wie Käse, Wein, Würsten und Sauerkraut kann es zu hohen Konzentrationen kommen. Unterschiedliche Milchsäurebakterien bilden die entsprechende Aminosäuredecarboxylasen, wodurch es während der Lebensmittelprozessierung bzw. bei mikrobieller Kontamination zur Anreicherung von biogenen Aminen kommen kann.

Der Gehalt an BA ist somit auch ein Indikator für den Verderb und der Sicherheit von Lebensmitteln [20].

2.9.1 Decarboxylierungsreaktion

Aminosäuredecarboxylasen sind Pyridoxal-5-phosphat (PLP) abhängige Enzyme, die eine Schiffssche Base aus Substrat und PLP bilden und so das C_{α} -Carbanion stabilisieren, das bei der Spaltung C_{α} -COO Bindung gebildet wird [19].

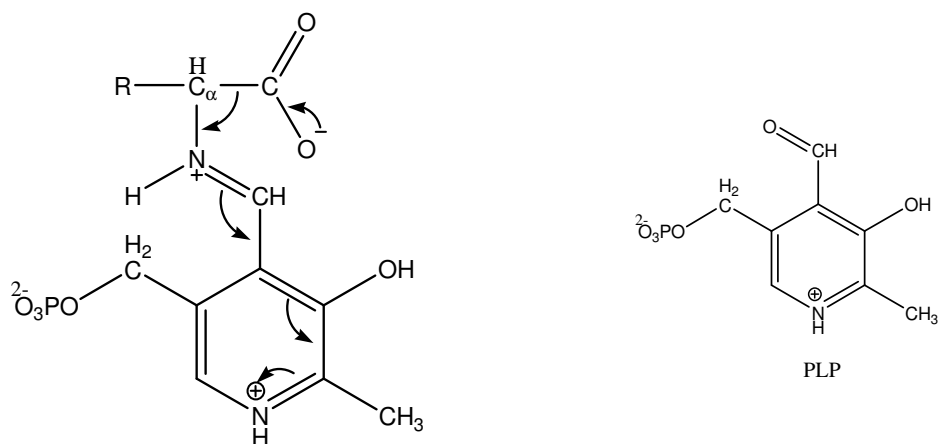


Abb.10: PLP- abhängige Decarboxylierung von Aminosäuren

2.9.2 Einfluss der Mikroflora des Weins auf die Bildung der biogenen Amine

Für die Bildung und Anreicherung von biogenen Aminen müssen drei fundamentale Faktoren erfüllt werden:

- (1) die entsprechende Aminosäure muss vorhanden sein
 - (2) Anwesenheit von Mikroorganismen mit Decarboxylaseaktivität
 - (3) vorherrschende Bedingungen müssen Wachstum und Enzymaktivität erlauben
- [21]

Traubensaft und Wein sind sehr selektive Medien und können das Wachstum einiger Spezies der Milchsäurebakterien (LAB) unterstützen. Es sind vor allem drei Gattungen präsent:

- (1) *Lactobacillus*
- (2) *Pediococcus*
- (3) *Oenococcus* (auch als *Leuconostoc* bezeichnet)

Während der alkoholischen Gärung besteht die Milchsäurebakterienpopulation hauptsächlich aus *Pediococ*en und *Oenococcus oeni*. Der homofermentative *Lactobacillus*, der vor allem auf den Trauben vorkommt, verschwindet sehr rasch nach dem Start der alkoholischen Gärung zugunsten des *Leuconostoc mesenteroides*, welcher am Ende der Gärung durch den *O. oeni* ersetzt wird [22].

Der pH-Wert ist der wichtigste Faktor der neben der biologischen Aktivität von Bakterien auch deren Vielfalt beeinflusst. Je höher der pH-Wert, umso komplexer die Mikroflora, weil der pH-Wert einen Selektivitätsfaktor für Mikroorganismen im Wein darstellt. Bei hohen pH-Werten werden immer größere Mengen an biogenen Aminen produziert. Dies resultiert aus dem verstärkten Bakterienwachstum und der größeren Bakteriendiversität [24].

Die Milchsäuregärung ist ein sekundärer Prozess in der Weinherstellung und wird nach der alkoholischen Gärung durchgeführt. Dieser zusätzliche Verarbeitungsschritt wird bei Rotweinen, aber auch häufig bei Weißweinen durchgeführt um die vorhandene Säure zu reduzieren, sensorische Eigenschaften zu verbessern und um die biologische Stabilität zu verbessern.

Während der Milchsäuregärung, auch als biologischer Säureabbau (BSA) bezeichnet, wird die strengere Apfelsäure in die mildere Milchsäure unter Freisetzung von CO₂ umgewandelt.

Oenococcus oeni ist der wichtigste Mikroorganismus während des BSA, da er an die niedrigen pH-Werte und hohen Alkoholkonzentrationen sehr gut angepasst ist.

Unter natürlichen Bedingungen dauert der BSA mehrere Wochen und oft ohne zufriedenstellendes Ergebnis. Um eine rasche, vollständige Milchsäuregärung zu erzielen werden dem Wein ausgewählte Stämme von *O. oeni* zugesetzt [23].

Für lange Zeit und teilweise auch heute noch glauben Önologen dass nur *Pediococcus*-Stämme für die Histaminbildung verantwortlich sind. Diese Stämme sind immer ein Teil der Weinmikroflora, zusammen mit *Lactobacillus* und *Oenococcus*, aber normalerweise in geringem Verhältnis.

Die Isolierung von Bakterienstämmen aus Weinen zeigte, dass es *O. oeni*-Stämme gibt deren genetischer Code eine Histidindecaboxylase beinhaltet [24].

G.C. Rollan *et al.* [25] ist es gelungen aus Weinen mit sehr hohen Histamingehalten *Leuc. oenos 9204* zu isolieren. Dieser Stamm besitzt die Fähigkeit Histidin zu decarboxylieren.

Am Ende der alkoholischen Gärung können Milchsäurebakterien durch den Abbau der vergärbaren Zucker, welche von der Hefe nicht verwendet wurden (Pentosen), wachsen. Milchsäurebakterien können auch Peptide, die sich durch die Autolyse der Hefe ansammeln, metabolisieren. Die von der Hefe freigesetzten Aminosäuren können nicht nur als Nährstoffquelle, sondern auch als Energiequelle verwendet werden [21].

Die Produktion von Histamin läuft bevorzugt bei sehr schlechten Nährstoffbedingungen ab. Dies deutet darauf hin, dass die Histidindecarboxylierung als zusätzlicher Mechanismus für die Energiegewinnung verwendet wird wenn sonst keine Substrate mehr vorhanden sind. Dies erklärt warum die Histaminkonzentration nach dem biologischen Säureabbau zunimmt.

Nach dem BSA wird der Wein geschwefelt um vorhandene Hefen und Bakterien, die für die weitere Verarbeitung nicht mehr erwünscht sind, zu eliminieren. Eine relativ hohe Population an Milchsäurebakterien ergibt sich oft einige Monate nach der Weinherstellung. Auch wenn die Bakterien nicht wachsen überleben solch latente Populationen und sind auch metabolisch aktiv – z.B. durch Produktion von Histamin. Die aktivste Phase liegt zwischen dem vierten und achten Monat nach der malolaktischen Gärung. Es konnten einige Decarboxylierungswege gezeigt werden welche den Milchsäurebakterien Energie liefern. Daraus folgt, dass Stämme die eine Aminosäuredecaboxylase exprimieren länger überleben und somit einen Wettbewerbsvorteil besitzen.

Der Gehalt an Histamin, Tyramin und Putrescin steigt kontinuierlich. Andere Amine wie Ethylamin, Phenylethylamin und Cadaverin befinden sich bereits im Traubensaft, können aber während der Herstellung des Weines zusätzlich entstehen oder auch abgebaut werden [24].

Studien zeigen, dass Weinkeller die meist sehr hohe Gehalte an biogenen Aminen produzieren, durch die Inokulation mit selektierten *O. oeni*-Stämmen die Bildung stark reduzieren konnten. Starterkulturen können unerwünschte Bakterien eliminieren oder auch gebildete biogene Amine abbauen [24].

Hohe Gehalte an Cadaverin und Putrescin können ein Hinweis auf eine schlechte Hygiene während des Herstellungsprozesses bzw. im Keller sein. Die Bildung von Cadaverin geht auf eine Kontamination mit Enterobakterien zurück. Jedoch ist der Gehalt dieser beiden Diamine kein gutes Maß für die tatsächliche Beurteilung der Hygiene da Putrescin und Cadaverin aus unterschiedlichsten Quellen stammen können [7].

2.10 Weinbau

2.10.1 Ursprünge des Weinbaus

Die Weinrebe gehört zur Gattung *Vitis* und zur Familie der *Vitaceae*, die insgesamt 12 Gattungen und 700 Arten umfasst. Die in Asien und Europa einzige zur Weinbereitung benutzte Art *Vitis vinifera* kann ein mächtig rankender Baum mit einer Länge von bis zu 40 m werden. Die Kulturrebe, aus der Wein gewonnen wird, ist eine Subspezies und wird *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* genannt. Die unterschiedlichen Reben wurden selektioniert und gekreuzt, sodass neue Formen entstanden. Der Beginn des Anbaus der Kulturrebe erfolgte schon um 7000v.Ch. im vorderasiatischen Gebiet, am Kaspischen Meer. Schätzungsweise gibt es heute etwa 5000 Sorten von Kulturreben, von denen aber nur relativ wenige für uns Bedeutung haben.

Wein selbst wurde erst um 4000v.Ch. bereitet. Viele Völker des Altertums schätzten den Wein als alkoholisches Getränk. Der Wein kam wahrscheinlich über wirtschaftliche Kontakte mit Sumer und Ägypten zu den Hochkulturen. Das gilt für die Griechen des mykenischen Zeitalters ebenso wie für die ägäischen Inseln Kreta, Rhodos und Zypern und für das kleinasiatische Festland. Von den Etruskern stammt der erste Korkverschluss einer Amphore. Sie verkauften Wein nach Burgund. Von Marseille aus gelangte der Weinbau über Handelswege, die zu Zinnlagern in Britannien führten, nach Gallien. Vor allem im römischen Reich spielte der Wein eine wesentliche Rolle. Der römische Weinbau wird ausführlich in einem Werk von Columella beschrieben, worin er vor allem über die verschiedenen Arten der Stockerziehung berichtet. Wein wurde auch zur Heilung von Krankheiten verwendet. Der 129n.Chr. in Pergamon geborene Arzt Galenus entwickelte viele noch heute verwendete Heilverfahren.

Der Verbrauch alkoholischer Getränke wurde erst mit der Einführung eines Konkurrenten, des »gekochten« Kaffees, dramatisch zurückgedrängt. Bereits nach dem 30jährigen Krieg waren viele Weinbaugebiete aufgegeben worden [27].

2.10.2 Weißweinherstellung

Der Zeitpunkt der Weinlese richtet sich nach Rebsorte, der Reife der Trauben, dem Gesundheitszustand, der Lage und nach der Witterung. Bei besonders warmer Witterung dürfen die Trauben nach der Lese nicht stehen bleiben, da es sowohl zu geschmacklichen als auch zu bakteriellen Beeinträchtigungen kommen kann. Die gelesenen Trauben werden vorsichtig gequetscht ohne dabei die Kerne zu beschädigen. Diese zerquetschten Beeren (Maische) von weißen Weintrauben sollen so rasch wie möglich gekeltert werden, um mögliche Qualitätseinbußen durch Oxidationsvorgänge und die Entwicklung schädlicher Mikroorganismen zu unterbinden. Beim Stehen lassen der Maische (Maischestandzeit) laufen insbesondere enzymatische Vorgänge ab, die positive Einflüsse auf die Pressfähigkeit und das Traubenaroma besitzen. Nachteilig ist die ebenfalls geförderte Aktivität der Polyphenoloxidasen. Beim Keltern wird die Maische in eine Presse gefüllt um den Saft (Most) herauszupressen. Wird der gewonnene Most einige Zeit stehen gelassen, so klärt er sich unter Absetzen aller festen und flockigen Trubteilchen (Entschleimen). Nach 12 – 24 Stunden trennt man den geklärten Most durch Ablassen vom Trub. Zur Verhinderung einer mikrobiellen Tätigkeit können dem Most vor dem Stehen lassen bis zu 50 mg/L schwefelige Säure zugesetzt werden. Eine bessere Klärung des Traubenmostes erzielt man durch Verwendung von Klärschleudern (Separatoren).

Der vorgeklärte Most wird mit Reinzuchthefen beimpft um die Gärung einerseits zu induzieren und um andererseits nur erwünschte Kulturen mit bekannten Eigenschaften zu haben. Der Verlauf der Gärung kann durch Faktoren wie Temperatur, Zuckergehalt und schwefelige Säure beeinflusst werden. Weißweine werden oftmals kühl und somit langsam vergoren um die primären Fruchtaromen der Trauben zu erhalten. Je nach angestrebten Restzucker- und Alkoholgehalt des Endproduktes dauert die Gärung 8 – 10 Tage.

Am Ende der Gärung sammelt sich der Hefetrub am Boden des Fasses. Bei Weinen mit noch zu hohem Säuregehalt kann in dieser Ausbauphase die Säureverminderung durch den biologischen Säureabbau (BSA) vorgenommen werden. Bei dem durch Milchsäurebakterien (z.B. *O. oeni*) bedingten Säureabbau wird L-Apfelsäure in L-Milchsäure überführt. Gefördert wird der biologische Säureabbau durch die Begünstigung bakterieller Vorgänge, wie Erhöhung der Temperatur auf 20 °C, pH-Werte im Bereich von 3,2 – 3,4, sowie keine zu hohen Ethanolgehalte und SO₂-Konzentrationen.

Die verwendete Technologie, unter Einbeziehung des BSA, bringt neben der Säureverminderung auch andere Vorteile. So wird unter anderem der Restzucker abgebaut,

die Weine sind „biologisch stabiler“ und außerdem werden Substanzen, die SO₂ zu binden vermögen, vermindert, was sich in der Gesamtbilanz der SO₂-Gehalte absenkend auswirkt.

Der Zeitpunkt des 1.Abstiches (Trennung des Weins von Heferückständen) richtet sich nach der Beschaffenheit des Weines, nach dem Gärverlauf, dem Säuregehalt und nach dem Grad der Klärung. In Verbindung mit dem 1.Abstich müssen die Weine geschwefelt werden. Das Ziel der anschließenden Lagerung des Fassweines ist es, diese zu biologisch, chemisch und physikalisch stabilen, harmonisch abgerundeten Produkten auszubauen. Während des Lagerns laufen im Wein noch zahlreiche Veränderungen ab.

Inhaltsstoffe, geladene Kolloide und Schutzkolloide, die den optischen Eindruck und das Aroma negativ beeinflussen können werden durch Schönen entfernt. Schönungsmittel sind kolloidale oder lösliche Verbindungen, die mit den entsprechend unerwünschten Substanzen einen Niederschlag bilden, der durch Klärung entfernt werden.

Zur Verminderung von Eiweißtrübungen werden Bentonite eingesetzt. Seine Teilchen sind negativ geladen und vermögen daher die Ladung der positiven Eiweißteilchen zu neutralisieren und somit das Eiweiß zu adsorbieren. Eiweiße wie Gelatine, Eiklar und Hausenblase dienen vor allem zur Entfernung von Polyphenolen, die Geruchs- und Geschmacksängel verursachen. Stabilisatoren werden benötigt, um Fällungen von Eisen- oder Kupferionen zu unterbinden. Mit Gummi arabicum, welches die Ionen in ein Schutzkolloid einbindet, oder mit Zitronensäure, welche die Ionen komplexiert, werden die Ionen in Lösung gehalten [28].

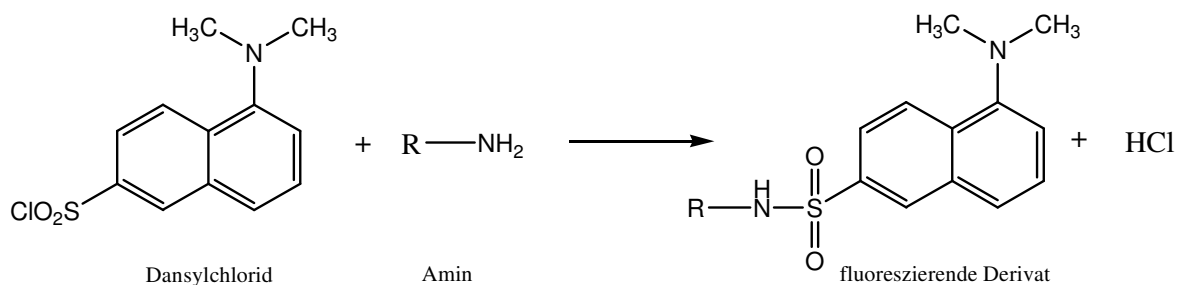
Für den Schutz von Wein ist die Schwefelung von großer Bedeutung, durch die Essig- und Milchsäurebakterien abgetötet werden. Richtig dosiert stabilisiert Schwefeldioxid das Bukett ohne zu stören. Ursache ist eine reversible Bindung des SO₂ an das C-Atom von Aldehyden und Ketonen die Teile des Aromas sind. Die Bindung des Schwefeldioxids ist nur locker, so dass ein Teil der Aromastoffe in freier Form vorliegt. Wenn dieser, etwa durch Oxidation umgewandelt wird, so wird aus dem gebundenen Schwefel nachgeliefert, so dass sich die Konzentration der Aromastoffe nicht ändert.

Medizinisch ist die Schwefelung innerhalb der erlaubten Konzentrationen unbedenklich. Vorsicht ist aber auch bei niedrigen Konzentrationen in Krankheitsfällen geboten, die einen Mangel an Sulfitoxidasen zur Folge haben (bei Steroidmangel) sowie bei Asthma. Nachgewiesen wurde im Tierversuch eine Verminderung von Thiamin (Vitamin B₁) durch SO₂ im Blut und Harn [27].

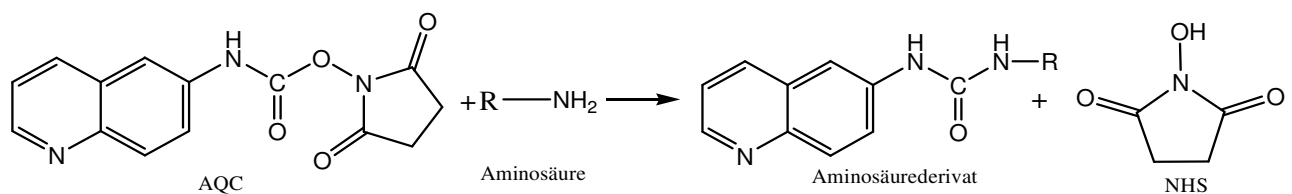
3. Methoden zur Analyse der Proben

Die Analyse der biogenen Amine und Aminosäuren erfolgte durch die High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Dabei kommt es zur Trennung der Substanzen auf einer Reversed Phase (RP) Säule aufgrund deren Verteilung zwischen stationärer und mobiler Phase und der ständigen Adsorption und Desorption der Substanzen an der Phasengrenzfläche. Die geringe Korngröße der stationären Phase verbessert die Trennleistung der Säule erheblich, bedingt aber auch wesentlich höhere Drücke um das Elutionsmittel durch das System zu pumpen. Die anschließende Detektion erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektor (FLD). Biogene Amine und Aminosäuren zeigen, mit Ausnahme der aromatischen, selbst keine natürliche Fluoreszenz. Durch die Umsetzung der Substanzen mit der fluoreszierenden Verbindung Dansylchlorid bzw. bei Aminosäuren mit 6-Aminochinolin-N-hydroxysuccinimidyl carbamat (AQC), ist eine Fluoreszenzanregung möglich. Der Vorteil einer Fluoreszenzdetektion gegenüber einer Detektion im UV/VIS Bereich besteht in der wesentlich höheren Sensitivität und Selektivität.

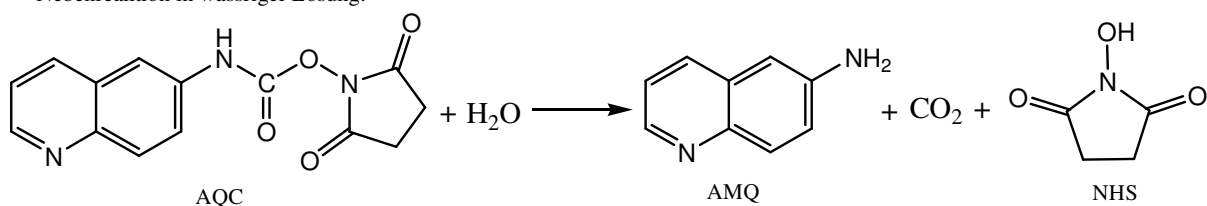
Amine:



Aminosäuren:



Nebenreaktion in wässriger Lösung:



AQC= 6-Aminochinolin-N-hydroxysuccinimidyl carbamat, NHS= N-Hydroxysuccinimid, AMQ= 6-Aminochinolin

Abb.11: Derivatisierungsreaktion der Amine und Aminosäuren

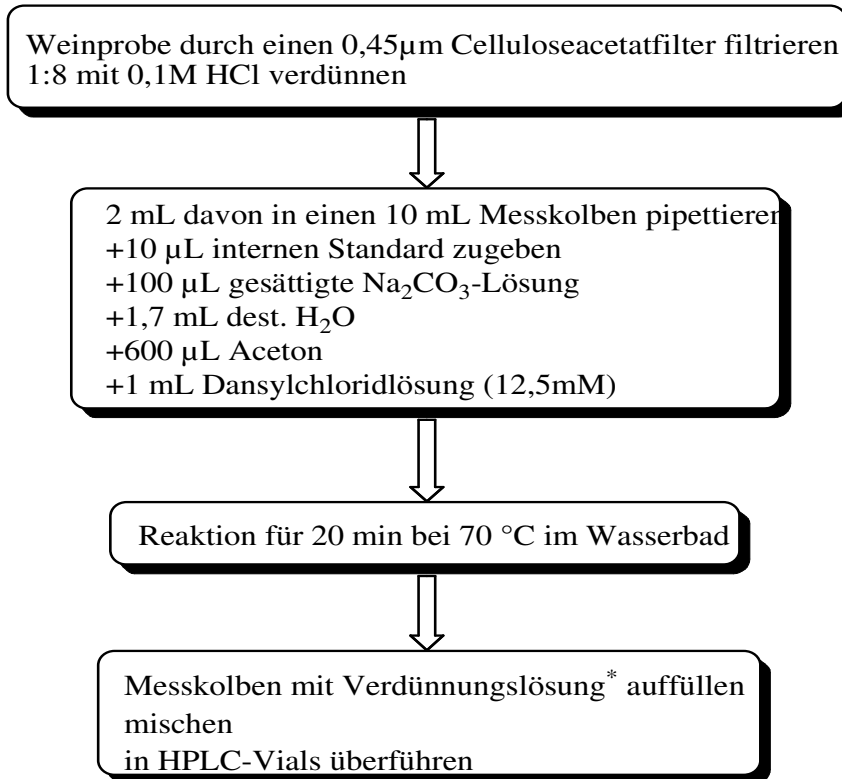
3.1 Geräteparameter

Tabelle 2: Geräteparameter zur Analyse der Amine und Aminosäuren

	Amine	Aminosäuren																																																																																																								
HPLC	Agilent, Series 1100																																																																																																									
Säule	LiChrospher RP18, 250x4mm, 5µm	Amino acid analysis column, Waters, 3.9x150mm, 4µm																																																																																																								
Detektor	FLD λ _{EX} =358 nm, λ _{EM} =503 nm, PMT-Gain 12	FLD λ _{EX} =250 nm, λ _{EM} = 395 nm, PMT-Gain 12																																																																																																								
Säulentemperatur	55 °C	39 °C																																																																																																								
Injektionsvolumen	5 µL																																																																																																									
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>t [min]</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>2</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>14</td><td>25</td><td>75</td></tr> <tr><td>16</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>20</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>21</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>30</td><td>60</td><td>40</td></tr> </tbody> </table>	t [min]	%A	%B	0	60	40	2	60	40	14	25	75	16	0	100	20	0	100	21	60	40	30	60	40	<table border="1"> <thead> <tr> <th>t [min]</th> <th>%A</th> <th>%B</th> <th>%C</th> <th>%D</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,0</td><td>90,0</td><td>10,0</td><td>0,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>0,5</td><td>89,0</td><td>10,0</td><td>1,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>17,0</td><td>89,0</td><td>10,0</td><td>1,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>20,0</td><td>88,0</td><td>10,0</td><td>2,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>30,0</td><td>86,0</td><td>9,0</td><td>5,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>35,0</td><td>73,0</td><td>18,0</td><td>9,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>36,0</td><td>63,0</td><td>25,0</td><td>12,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>*36,5</td><td>0,0</td><td>87,5</td><td>12,5</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>*36,8</td><td>22,0</td><td>65,5</td><td>12,5</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>*40,0</td><td>22,0</td><td>65,0</td><td>13,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>*50,0</td><td>22,0</td><td>63,0</td><td>15,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>*50,1</td><td>0,0</td><td>0,0</td><td>60,0</td><td>40,0</td></tr> <tr><td>57,0</td><td>0,0</td><td>0,0</td><td>60,0</td><td>40,0</td></tr> <tr><td>57,5</td><td>90,0</td><td>10,0</td><td>0,0</td><td>0,0</td></tr> <tr><td>66,5</td><td>90,0</td><td>0,0</td><td>0,0</td><td>0,0</td></tr> </tbody> </table>	t [min]	%A	%B	%C	%D	0,0	90,0	10,0	0,0	0,0	0,5	89,0	10,0	1,0	0,0	17,0	89,0	10,0	1,0	0,0	20,0	88,0	10,0	2,0	0,0	30,0	86,0	9,0	5,0	0,0	35,0	73,0	18,0	9,0	0,0	36,0	63,0	25,0	12,0	0,0	*36,5	0,0	87,5	12,5	0,0	*36,8	22,0	65,5	12,5	0,0	*40,0	22,0	65,0	13,0	0,0	*50,0	22,0	63,0	15,0	0,0	*50,1	0,0	0,0	60,0	40,0	57,0	0,0	0,0	60,0	40,0	57,5	90,0	10,0	0,0	0,0	66,5	90,0	0,0	0,0	0,0
t [min]	%A	%B																																																																																																								
0	60	40																																																																																																								
2	60	40																																																																																																								
14	25	75																																																																																																								
16	0	100																																																																																																								
20	0	100																																																																																																								
21	60	40																																																																																																								
30	60	40																																																																																																								
t [min]	%A	%B	%C	%D																																																																																																						
0,0	90,0	10,0	0,0	0,0																																																																																																						
0,5	89,0	10,0	1,0	0,0																																																																																																						
17,0	89,0	10,0	1,0	0,0																																																																																																						
20,0	88,0	10,0	2,0	0,0																																																																																																						
30,0	86,0	9,0	5,0	0,0																																																																																																						
35,0	73,0	18,0	9,0	0,0																																																																																																						
36,0	63,0	25,0	12,0	0,0																																																																																																						
*36,5	0,0	87,5	12,5	0,0																																																																																																						
*36,8	22,0	65,5	12,5	0,0																																																																																																						
*40,0	22,0	65,0	13,0	0,0																																																																																																						
*50,0	22,0	63,0	15,0	0,0																																																																																																						
*50,1	0,0	0,0	60,0	40,0																																																																																																						
57,0	0,0	0,0	60,0	40,0																																																																																																						
57,5	90,0	10,0	0,0	0,0																																																																																																						
66,5	90,0	0,0	0,0	0,0																																																																																																						
Fluss	1,00mL/min	1,00mL/min bzw. *1,30 mL/min																																																																																																								
Eluent	<p>A: 40 mM Natriumacetat 100 mL Dimethylformamid (DMF) 2,3 mL Triethylamin (TEA) verd. Essigsäure pH 5,0 einstellen</p> <p>B: 875 mL Acetonitril HPLC grade 100 mL <i>tert.</i>-Butylmethyleher 25 mL H₂O</p>	<p>A: 100 ml Konzentrat (148 g/L Natriumacetat trihydrat + 7,06 g/L TEA, pH 5,70 50% Phosphorsäure) mit 1,100 L H₂O dest. vermischen</p> <p>B: 100 mL Konzentrat (148 g/L Natriumacetat trihydrat + 7,06 g/L TEA pH 6,80 50% Phosphorsäure) mit 1,100 L H₂O dest. vermischen</p> <p>C: Acetonitril HPLC gradient grade</p> <p>D: H₂O dest.</p>																																																																																																								

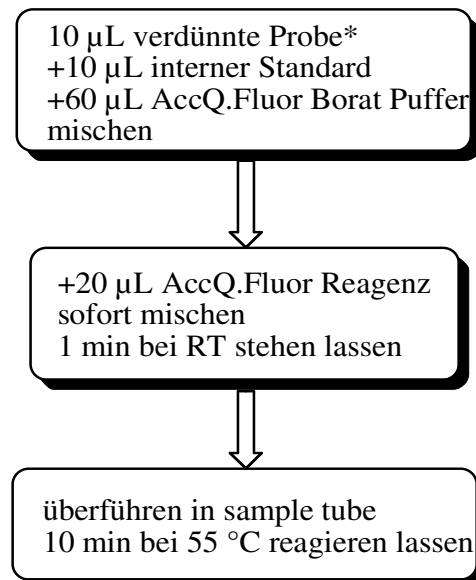
3.2 Probenvorbereitung

Amine:



*Zusammensetzung siehe Anhang

Aminosäuren:



*entsprechende Verdünnung siehe Tabelle im Anhang

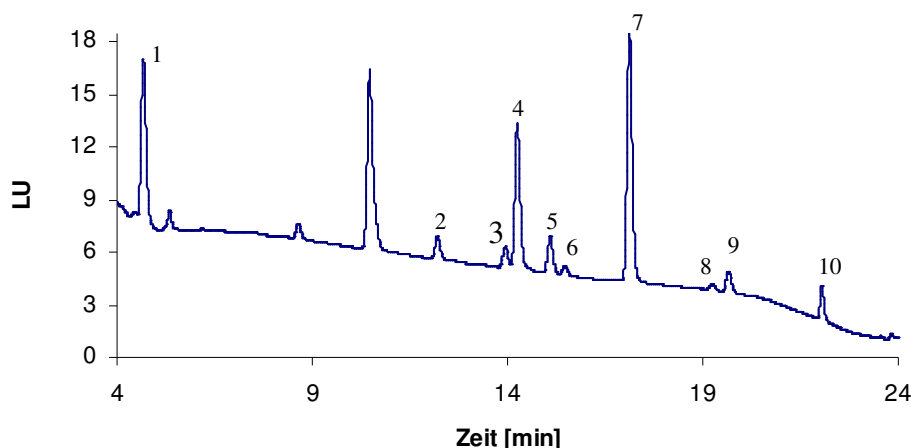
Die Derivatisierung der Aminosäuren erfolgte unter Verwendung eines Aminosäure-Kit von Waters.

Abb.12: Flussdiagramm der Probenvorbereitung zur Bestimmung der BA und Aminosäuren

Für die Analyse der Amine wurde die Methode von *R. Romero et al.* [34] verwendet, wobei eine Optimierung der Methode für eine vollständige Trennung der Substanzen erfolgte. Die Säulentemperatur musste von 40 °C auf 55 °C erhöht werden da ansonsten eine Trennung von Cadaverin und Histamin nicht möglich war. Um auch Ethanolamin detektieren zu können wurde das Gradientenprofil geringfügig verändert indem der Trennungsvorgang mit 40 %B anstatt 55 % gestartet wurde. Die Detektion der Aminderivate erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor. Die dafür notwendige Anregungs- und Emissionswellenlänge wurde auf Histamin optimiert. Grundsätzlich eignet sich die Methode sehr gut für die Bestimmung der Amine. Probleme bei der Fluoreszenzdetektion ergeben sich durch Substanzen oder Moleküle wie Sauerstoff, weil diese die Fluoreszenz quenchen können und die Analyse daher in ihrer Empfindlichkeit verringern. Die Chromatogramme der Amine zeigen, dass Laufmittel A eine Grundfluoreszenz besitzt. Daher ändert sich die Basislinie mit der Veränderung des Elutionsgradienten. Ursache dafür können Stabilisatoren in den verwendeten Lösungsmitteln sein.

Die Identifizierung der Substanzen erfolgte über deren Retentionszeit mit Hilfe eines Standardgemisches. Histamin zeigt im Vergleich zu den restlichen Aminen ein relativ schwaches Signal.

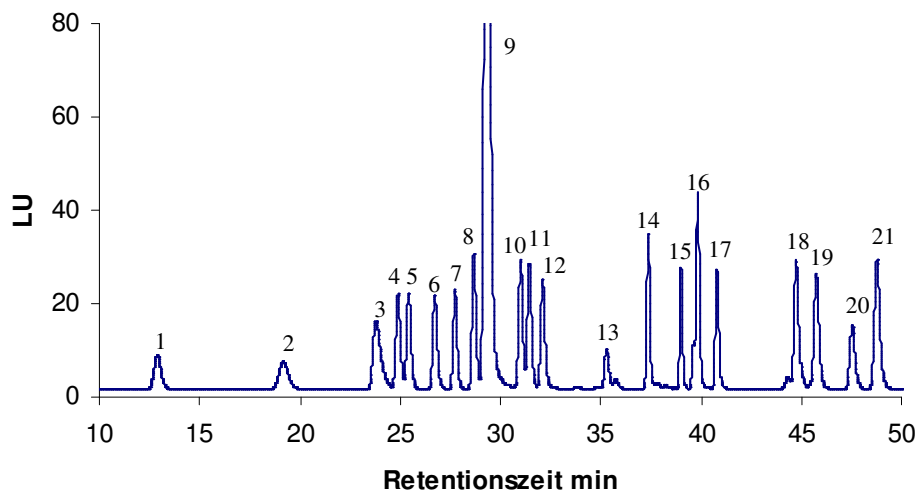
3.3 Chromatogramme der Standardgemische



1= Ethanolamin, 2= Tryptamin, 3= β -Phenylethylamin, 4= Putrescin, 5= Cadaverin, 6= Histamin, 7= IS (1,7-DiaminohaepTan), 8= Tyramin, 9=Spermidin, 10= Spermin

Abb.13: Chromatogramm des Aminstandards

Für den Aminosäurestandard ergab sich folgendes Chromatogramm.



1=Asparaginsäure, 2=Glutaminsäure, 3=AMQ, 4=Serin, 5=Asparagin, 6=Glycin, 7=Glutamin, 8=Histidin, 9=NH₃, 10=Threonin, 11=Arginin, 12=Alanin, 13=Prolin, 14=IS, 15=Tyrosin, 16=Valin, 17=Methionin, 18=Isoleucin, 19=Leucin, 20=Lysin, 21=Phenylalanin

Abb.14: Chromatogramm des Aminosäurestandards

3.4 Quantifizierungsmethoden

Die Quantifizierung der Amine erfolgte unter Verwendung eines internen Standards. Dabei wird einer Referenzprobe und der Analysenprobe dieselbe Menge einer definierten Substanz (interner Standard) zugegeben, die in der Analysenprobe nicht enthalten sein darf. Idealerweise ist dieser interne Standard dem Analyten chemisch sehr ähnlich. Aus den Verhältnissen der beiden Signale beider Proben (Referenz- und Analysenprobe) und dem bekannten Gehalt x_s der Referenzprobe ergibt sich der gesuchte Gehalt x_a der Analysenprobe [30].

$$x_a = \frac{y_{i,s}}{y_s} \times \frac{y_a}{y_{i,a}} \times x_s \quad \text{(Gleichung 1)}$$

- x_a ... Konzentration des entsprechenden Amins in der Analysenprobe
- $y_{i,s}$... Fläche des internen Standards in der Referenzprobe
- y_{bA} ... Fläche des entsprechenden Amins in der Referenzprobe
- y_a ... Fläche des entsprechenden Amins in der Analysenprobe
- $y_{i,a}$... Fläche des internen Standards in der Analysenprobe
- x_s ... Konzentration des entsprechenden Amins in der Referenzprobe

Als interner Standard wurde 1,7 Diaminoheptan verwendet. Insgesamt wurden die neun Amine Ethanolamin, Tryptamin, β -Phenylethylamin, Putrescin, Cadaverin, Histamin, Tyramin, Spermin und Spermidin analysiert.

Die Auswertung der Aminosäuregehalte wurde unter Verwendung einer Kalibration mit externem Standard vollzogen. Dabei wird eine Kalibrationsgerade erstellt und der Gehalt des Analyten y_p über die Umkehrfunktion der Kalibrierfunktion $y = k \cdot x + d$ erhalten [30].

$$x_p = \frac{y_p - d}{k} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

x_p ... errechnete Analytkonzentration

y_p ... Fläche des Analyten

d ... Schnittpunkt der Geraden mit der y -Achse

k ... Steigung der Gerade

Es wurden die Aminosäuren Glutamin, Histamin, Arginin, Tyramin, Lysin und Phenylalanin als Vorstufen für die biogenen Amine ausgewertet. Zur Kontrolle der Analyse wurde als interner Standard α -Aminobuttersäure verwendet.

4. Validierung

Validierung ist der Beweis, dass die Methode für den vorhergesehenen Verwendungszweck geeignet ist [29].

Die Auswertung der Validierungsdaten erfolgte Software unterstützt unter Verwendung des Excel Makros Validata, Version 3.02.48, von Prof. Christian Wegscheider. Validierungsparameter dabei sind die Reproduzierbarkeit, die Linearität und die Bestimmung der Nachweisgrenze. Die Validierung der einzelnen Substanzen erfolgte im gewünschten Arbeitsbereich, so dass sich die zu erwartenden Analytkonzentrationen möglichst im unteren Validierungsbereich befanden.

Für die Validierung wurden Standardreihen mit vier Konzentrationspunkten für alle neun Amine erstellt. Dabei wurde die erste und letzte Konzentrationsstufe viermal vermessen, die beiden mittleren zweimal.

Konzentrationsbereiche der Amine:

- Cadaverin: 60 – 210 ng/mL
- Ethanolamin: 60 – 220 ng/mL
- Histamin: 250 – 1000 ng/mL
- β -Phenylethylamin: 20 – 160 ng/mL
- Putrescin: 10 – 160 ng/mL
- Tryptamin: 20 – 260 ng/mL
- Tyramin: 60 – 210 ng/mL
- Spermidin: 60 – 210 ng/mL
- Spermin: 65 – 230 ng/mL

Alle neun Substanzen konnten in diesem Bereich normgerecht validiert werden. Die Ergebnisse der Validierung befinden sich im Anhang.

4.1 Wiederfindung

Als Maß für die Richtigkeit eines Verfahrens ist die Angabe der Wiederfindungsrate üblich. Sie beschreibt welcher Prozentanteil der wahren Konzentration wiedergefunden wird.

Die Wiederfindungsrate wurde mit Hilfe der Aufstockmethode ermittelt. Dabei werden der Analysenprobe steigende Gehalte definierter Mengen Analyt zugesetzt. Zur Ermittlung der Wiederfindungsraten werden die Soll-Konzentrationen gegen die wiedergefundenen Konzentrationen aufgetragen. Die Steigung der daraus resultierenden Gerade mit hundert multipliziert ergibt die Wiederfindung in Prozent [30].

Die Wiederfindung wurde für Histamin, Ethanolamin und Putrescin bestimmt.

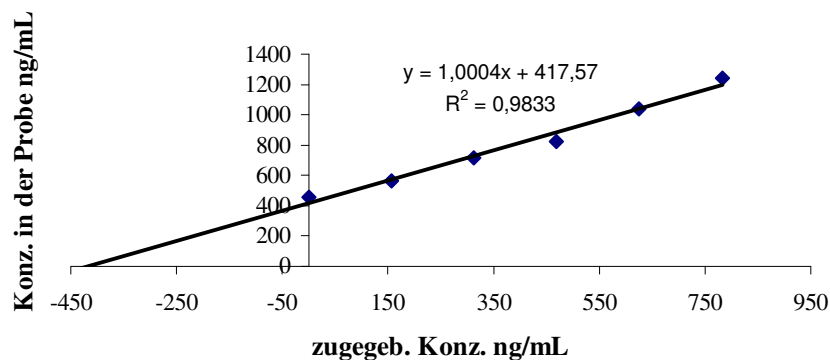


Abb.15: Bestimmung der Wiederfindung von Histamin

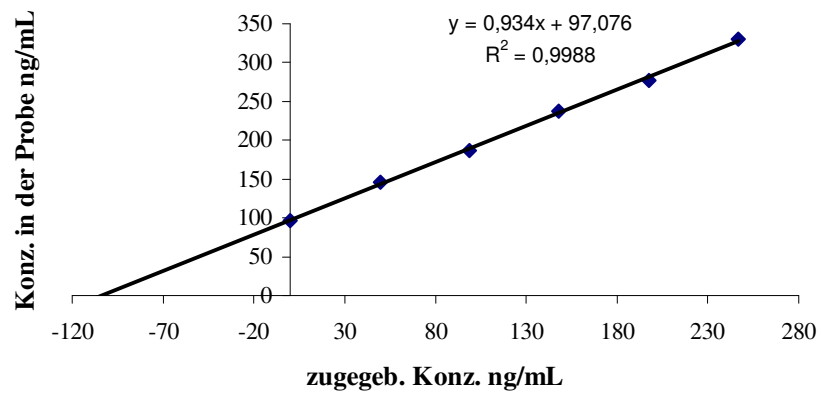


Abb.16: Bestimmung der Wiederfindung von Putrescin

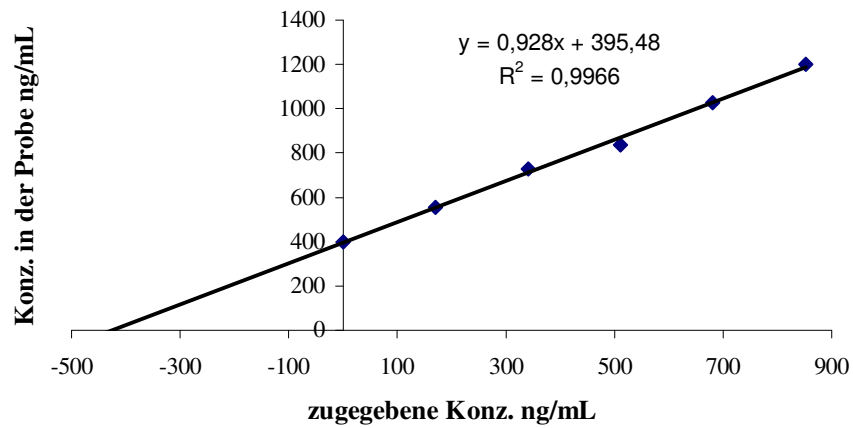


Abb.17: Bestimmung der Wiederfindung von Ethanolamin

Es ergeben sich daraus folgende Wiederfindungsraten:

- Histamin: 100 %
- Putrescin: 93 %
- Ethanolamin: 93 %

4.2 Methodenpräzision

Die Methodenpräzision ist ein Maß für die Schwankungen der Ergebnisse, die durch alle Schritte der Methode verursacht werden.

Für die Bestimmung werden sechs Standardlösungen unabhängig voneinander derivatisiert, analysiert und der Variationskoeffizient bestimmt. Für die Berechnung wurden die integrierten Peakflächen verwendet.

$$V_K = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (\text{Gleichung 3})$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Tabelle 3: Variationskoeffizienten der Amine

	V _k %
Ethanolamin	7,4
Tryptamin	4
Phenylethylamin	7,3
Putrescin	7,3
Cadaverin	8,6
Histamin	6,7
Tyramin	10,7
Spermidin	10,6
Spermin	8,4
IS	3,9

5. Probenbeschreibung

5.1 Weinproben

Für die Analyse wurden 45 Proben aus der südsteirischen Weinregion und zum Vergleich 14 internationale Weine herangezogen. Die Auswahl der Proben, sowie die Probennahme erfolgten über den Projektbetreuer der Landesversuchsanstalt Haidegg.

Bei den Proben handelt es sich um Qualitätsweine des Jahrgangs 2003. Der Großteil der Weine durchlief eine Prozessierung die einen biologischen Säureabbau und eine anschließende Lagerung in Holzfässern inkludierte. Vor allem solche Weine haben aufgrund des gewählten Herstellungsverfahrens ein erhöhtes Potential für biogene Amine. Ein zusätzlicher Faktor für den Verdacht auf erhöhte Konzentrationen in diesen Weinen ergab sich aus den Besonderheiten des Weinbaujahres 2003.

5.1.2 Charakterisierung des Weinbaujahres 2003

Die Rebblüte erfolgte in diesem Jahr früher als üblich, das Frühjahr und der Sommer waren außergewöhnlich trocken und heiß. Auf steilen Lagen zeigten sich bereits im Sommer Trockenschäden. Folge dieses Trockenstresses war ein Schrumpfen der Beeren und Vertrocknen der Blätter. Es kam zu Sonnenbränden auf den Beeren, die zu höheren Gehalten an Polyphenolen im Most führten, was sich wiederum im bitteren Geschmack des Weines zeigt.

Auch der anschließende Herbst war sehr trocken. Daher war die Traubenreife sehr hoch, die Versorgung der Trauben gering bzw. der daraus gepresste Most hatte einen geringeren Nährstoffgehalt. Dadurch war für die anschließende Gärung der Nährstoffbedarf der Hefe wesentlich höher. Allgemein konnten höhere Zuckergehalte, hohe physiologische Reife und eine hohe Dichte sowie geringe Säuregehalte verzeichnet werden. Das Verhältnis Apfelsäure/Weinsäure liegt durchschnittlich bei 50:50, im Jahr 2003 verschob es sich jedoch zugunsten der Weinsäure auf 30:70. Weiters konnten auch höhere pH-Werte, 3,3 – 3,5 festgestellt werden. Diese Werte sind für steirische Verhältnisse sehr hoch.

Bei der Lese der Trauben war es unüblich warm (25 °C) und dies führte dazu, dass die Trauben warm in den Keller kamen. Viele Weinbauern haben nicht die technische Möglichkeit das Lesegut zu kühlen. Dieser Umstand führte zu erheblichen Problemen aus mikrobiologischer Sicht. Weiters ergaben sich Probleme bei der Klärung des Mostes. Durch

den hohen pH-Wert zeigte der SO₂-Eintrag nicht seine gewünschte Wirkung, es kam zu Fehlgärungen ausgelöst durch wilde Hefen. Der Verlauf der Gärung erwies sich allgemein als problematisch. Aus den hohen Zuckergehalten resultierten hohe Alkoholgehalte und überstiegen oft die Toleranzgrenze der *S. cerevisia*. Vor allem bei der Endgärung ergaben sich häufig Probleme, die Gärung verzögerte sich. Dadurch kam es wiederum zum spontanen Säureabbau. Ein schlecht verlaufender BSA zeigt sich vor allem durch starke Diacetylnoten. Da jedoch der biologische Säureabbau oft spontan mit der Gärung verlaufen ist waren diese unerwünschten Noten sensorisch nicht merkbar.

5.1.3 Probenliste

Tabelle 4: Liste der analysierten Weinproben

Nr	Sorte	Jahrgang	Verarbeitung / Lagerung	Probenart
1	Morillon „Lignum“	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
2	Sauvignon „Reserve“	2003	ohne BSA, 50% im Holzfass	Fassprobe
3	Morillon „Select“ ohne BSA	2003	mit BSA 1/3 Holzfass	Fassprobe
4	Morillon	2002/03	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
5	Sauvignon „Reserve“	2003	ohne BSA, im Holzfass	Fassprobe
6	Traminer „Reserve“	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
7	Chardonnay	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
8	Sauvignon „Reserve“	2003	ohne BSA, im Holzfass	Fassprobe
9	Morillon „Obegg“	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
10	Pinot Gris Pössnitzberg „Reserve“	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
11	Sauvignon Czamillonberg „Reserve“	2003	im Holzfass	Fassprobe
12	Chardonnay Czamillonberg „Reserve“	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
13	Morillon (1. Befüllung)	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
14	Morillon (2. Befüllung)	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
15	Morillon/Sauvignon	2003	Morillon mit BSA, 50% im Holzfass	Fassprobe
16	Morillon/Sauvignon	2003	mit BSA, je 50% im Holzfass	Fassprobe
17	Sauvignon	2003	im Holzfass	Fassprobe
18	Chardonnay	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
19	Pinot Gris Lage	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
20	Sauvignon Lage	2003	im Holzfass	Fassprobe
21	Pinot Blanc Lage	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
22	Pinot Gris „Linea“	2000	mit BSA, im Holzfass	Flaschenprobe
23	Grauburgunder „Saziani“	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
24	Morillon „Moarfeitl“	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
25	Sauvignon „Moarfeitl Reserve“	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
26*	Königsberg (50%ZW, 50% St.L.)	2002	mit BSA, im Holzfass	Flaschenprobe
27*	St. Laurent	2003	ohne BSA, Edelstahltank	Fassprobe
28	Chardonnay „Selection“	2003	ohne BSA, 50% im Holzfass	Flaschenprobe
29**	Schilcher Barrique rosé	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
30	Morillon	2003	teilweise BSA, Edelstahltank	Flaschenprobe

31	Pinot Klinzel	2003	mit BSA, im Holzfass	Flaschenprobe
32	Eruption	2003	mit BSA, im Holzfass	Flaschenprobe
33*	Roter Koasasteffl	2002	mit BSA, im Holzfass	Flaschenprobe
34	Chardonnay „Selection“	2003	ohne BSA, Edeltank	Flaschenprobe
35	Chardonnay „Engabrunner Hüttweg“	2003	ohne BSA, Edeltank	Flaschenprobe
36	Morillon „Nussberg“	2000	mit BSA, im Holzfass	Flaschenprobe
37	Weißburgunder	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
38	Weißburgunder	2003	ohne BSA, im Holzfass	Fassprobe
39	Traminer	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
40	Traminer	2003	ohne BSA, im Holzfass	Fassprobe
41	Morillon	2003	mit BSA, im Holzfass	Fassprobe
42	Morillon	2003	ohne BSA, im Holzfass	Fassprobe
43	Morillon „Katzianer“	2003	ohne BSA, Edeltank	Fassprobe
44	Weißburgunder „Katzianer“	2003	ohne BSA, Edeltank	Flaschenprobe
45	Ruländer „Katzianer“	2003	ohne BSA, Edeltank	Flaschenprobe
46	Chardonnay (USA)	2003		
47	Bianco (I)	2003		
48	Pinot Grigio (I)	2003		
49	Chardonnay Südafrika	2003		
50	Sauvignon (F)	2003		
51	Chardonnay	2003		
52	Chardonnay	2003		
53	Sauvignon (Chile)	2003		
54	Chardonnay (I)	2003		
55	Pinot bianco (I)	2003		
56	Pinot Grigio (I)	2003		
57	Sauvignon (I)	2003		
58	Tocai Friulani (I)	2003		
59	Collio bianco (I)	2003		

*Rotwein

**Roséwein

Die Lagerung der Weine in Edeltanks dauert ungefähr 3 Monate, eine Lagerung in Holzfässern dauert hingegen ungefähr 8 – 12 Monate.

5.2 BSA-Versuch

Neben der Analyse der Weinproben ist es eine weitere Aufgabe die Bildung der biogenen Amine während der Hauptgärung und des anschließenden biologischen Säureabbaus zu verfolgen. Die Bildung der Amine erfolgt wie bereits erwähnt vor allem während des BSA durch die entsprechenden Mikroorganismen. Mit Hilfe dieses Versuchsansatzes soll beobachtet werden ob unterschiedliche Varianten des BSA zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Dafür wurden in der Landesversuchsanstalt für Obst und Weinbau (Haidegg) fünf unterschiedliche Varianten für die Durchführung des biologischen Säureabbaus angesetzt. Für jede dieser Varianten wurde ein Doppelansatz durchgeführt.

Folgende Versuchsvarianten wurden angesetzt:

- Kontrolle ohne BSA
- Simultangärvariante (Hauptgärung und BSA finden gleichzeitig statt)
- Spontan eingesetzter BSA
- BSA unter Verwendung des Stammes uvaferm Beta
- BSA unter Verwendung von Viniflora CH35

Viniflora CH35 ist eine gefriergetrocknete Bakterienkultur für den biologischen Säureabbau im Wein. Es handelt sich dabei um eine Reinkultur des *Oenococcus oeni* welche selektioniert wurde und sich besonders für Weiß- und Roséweine eignet. Laut Entwickler Chr. Hansen A/S erzeugt Viniflora CH35 keine biogenen Amine und weist keinen Argininstoffwechsel auf. Optimale Bedingungen für CH35 sind Temperaturen im Bereich von 18 – 22 °C, ein Alkoholgehalt bis zu 14 %vol und pH-Werte die nicht unter 3,0 liegen [31].

Auch uvaferm Beta ist ein *O. oeni* Kultur. Beta wurde in Italien isoliert und ist bestens geeignet die Tanninstruktur und die Aromen von roten Beeren in Rotweinen zu unterstützen. Der Name Beta leitet sich von der Fähigkeit ab, die Gehalte an β -Damascenon (Aromen, die zum blumigen Charakter in Rotweinen beitragen) zu erhöhen. Der Stamm arbeitet optimal bei pH-Werten > 3,2, Temperaturen über 14 °C und Alkoholgehalten bis zu 14 %vol [32].

In diesen Versuchsvarianten wird nicht nur die Veränderung der Aminzusammensetzung bestimmt, sondern auch die der Aminosäuren. Aminosäuren stellen die Vorstufe für Amine dar. Entsprechende Konzentrationen sind also eine Grundvoraussetzung für die Bildung dieser Verbindungen. Bei einer intensiven Aminbildung müsste eine Korrelation zwischen Aminosäurenabnahme und Aminzunahme bestehen.

5.2.1 Probenliste der Versuchsvarianten

Tabelle 5: Proben zur Verfolgung der Aminbildung während der Hauptgärung und BSA

Nr	Bezeichnung	Datum der Probenahme
1	Ausgangsmost (Ruländer)	27.10.2004
2	Kontrolle ohne BSA (BSA 1)	11.11.2004
3	Kontrolle ohne BSA (BSA 7)	
4	Simultangärvariante (BSA 4)	
5	Simultangärvariante (BSA 10)	
6	Spontaner BSA (BSA 5)	22.11.2004
7	Spontaner BSA (BSA 11)	
8	Simultangärvariante (BSA 4)	
9	Simultangärvariante (BSA 10)	
10	Kontrolle ohne BSA (BSA 1)	24.11.2004
11	Kontrolle ohne BSA (BSA 7)	
12	Stamm CH35 (BSA 2)	
13	Stamm CH35 (BSA 8)	
14	Stamm β (BSA 3)	
15	Stamm β (BSA 9)	
16	Spontaner BSA (BSA 5)	
17	Spontaner BSA (BSA 11)	
18	Stamm CH35 (BSA 2)	26.11.2004
19	Stamm CH35 (BSA 8)	
20	Stamm β (BSA 3)	
21	Stamm β (BSA 9)	
22	Spontaner BSA (BSA 5)	
23	Spontaner BSA (BSA 11)	28.11.2004
24	Stamm CH35 (BSA 2)	
25	Stamm CH35 (BSA 8)	
26	Stamm β (BSA 3)	
27	Stamm β (BSA 9)	
28	Spontaner BSA (BSA 5)	30.11.2004
29	Spontaner BSA (BSA 11)	
30	Stamm CH35 (BSA 2)	
31	Stamm CH35 (BSA 8)	
32	Stamm β (BSA 3)	
33	Stamm β (BSA 9)	
34	Spontaner BSA (BSA 5)	
35	Spontaner BSA (BSA 11)	

Von diesen Proben des BSA-Versuchs wurden nicht nur die Gehalte an biogenen Aminen bestimmt, sondern auch die Veränderung der Aminosäurezusammensetzung während des Verlaufs verfolgt.

6. Auswertung der Ergebnisse

6.1 Ergebnisse der Weinproben

Wie bereits unter 3.2 beschrieben, erfolgte die Ermittlung der Amingehalte durch die Verwendung eines internen Standards (IS). Durch die Bildung des doppelten Verhältnisses der Peakflächen und der Multiplikation mit der bekannten Konzentration im Standard, kann auf die Konzentration in der Probe zurückgerechnet werden.

Nachstehend sind die Ergebnisse der Weinanalyse tabellarisch und graphisch in Form von Histogrammen dargestellt. Die graphische/statistische Auswertung berücksichtigt nur die Daten der steirischen Weine. Insgesamt wurden 45 steirische Weißweine vermessen wobei bei 38 der Proben eine Lagerung im Holzfass erfolgte und bei 28 Proben ein biologischer Säureabbau durchgeführt wurde.

Alle Weine wurden zweimal vermessen, wobei die Probenvorbereitung voneinander unabhängig durchgeführt wurde. Die in der Tabelle angeführten Werte stellen Mittelwerte der beiden Messungen dar.

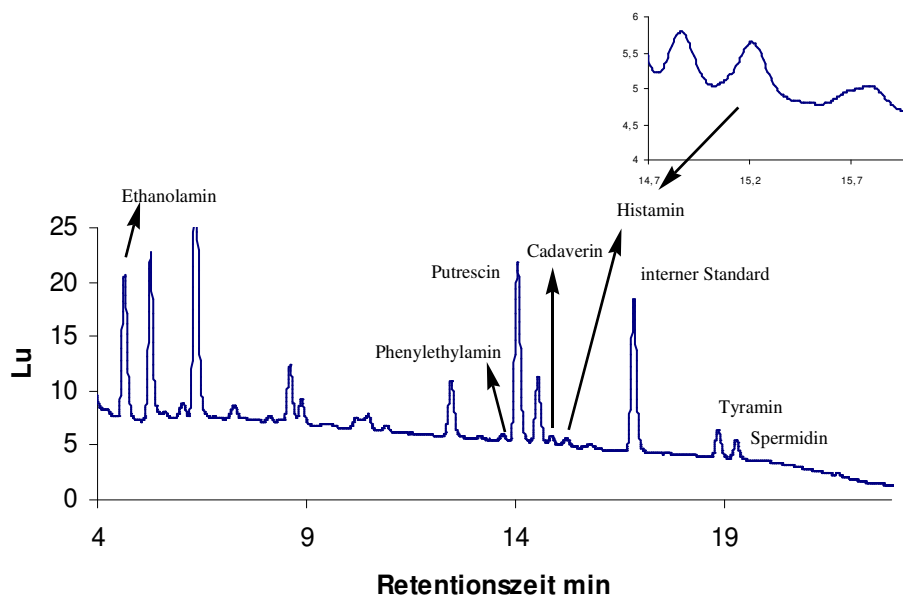


Abb.18: Chromatogramm der Amine im Wein

Die beiden Amine Tryptamin und Spermin konnten in keiner der Weinproben nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Amingehalte der Weine

Nr	Sorte	Konzentration [mg/L]									ΣAmine
		Ethanolamin	Tryptamin	βPhenylethylamin	Putrescin	Cadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin	
1	Morillon "Lignum"	14,6	n.n.	0,2	1,3	u.B.	7,5	n.n.	1,7	n.n.	25,2
2	Sauvignon "Reserve"	11,5	n.n.	n.n.	1,6	u.B.	6,9	n.n.	0,1	n.n.	20,1
3	Morillon "Select" ohne BSA	5,1	n.n.	n.n.	0,5	u.B.	6,6	n.n.	n.n.	n.n.	12,2
4	Morillon mit BSA	6,4	n.n.	n.n.	0,6	u.B.	6,4	n.n.	n.n.	n.n.	13,4
5	Sauvignon "Reserve"	20,4	n.n.	0,1	3,5	0,2	20,8	n.n.	0,3	n.n.	45,3
6	Traminer "Reserve"	16,7	n.n.	n.n.	4,6	0,1	17,8	n.n.	n.n.	n.n.	39,2
7	Chardonnay	16,2	n.n.	0,1	3,0	0,2	24,1	n.n.	1,7	n.n.	45,1
8	Sauvignon "Reserve"	16,7	n.n.	u.B.	3,5	0,2	6,9	n.n.	n.n.	n.n.	27,3
9	Morillon "Obegg"	9,2	n.n.	n.n.	3,6	0,1	9,4	n.n.	1,6	n.n.	23,9
10	Pinot Gris Pössnitzberg "Reserve"	16,2	n.n.	0,2	1,4	u.B.	7,1	n.n.	n.n.	n.n.	24,9
11	Sauvignon Czumillenberg Reserve	16,6	n.n.	n.n.	1,8	0,3	9,3	n.n.	1,3	n.n.	29,5
12	Chardonnay Czumillenberg Reserve	11,8	n.n.	0,1	6,0	0,3	4,6	n.n.	1,2	n.n.	23,9
13	Morillon (1. Befüllung)	18,2	n.n.	0,3	15,0	0,3	16,5	n.n.	1,2	n.n.	51,5
14	Morillon (2. Befüllung)	18,1	n.n.	0,4	16,8	0,4	18,0	n.n.	1,6	n.n.	55,3
15	Morillon/Sauvignon	16,3	n.n.	0,1	1,3	u.B.	6,7	n.n.	0,2	n.n.	24,6
16	Morillon/Sauvignon	18,2	n.n.	0,2	2,6	u.B.	7,5	n.n.	n.n.	n.n.	28,5
17	Sauvignon	18,6	n.n.	0,1	2,0	u.B.	8,4	n.n.	0,3	n.n.	29,4
18	Chardonnay	13,4	n.n.	0,2	0,7	u.B.	5,5	n.n.	n.n.	n.n.	19,8
19	Pinot Gris Lage	16,8	n.n.	0,3	1,9	u.B.	8,1	n.n.	0,5	n.n.	27,6
20	Sauvignon Lage	17,8	n.n.	n.n.	3,4	u.B.	13,1	n.n.	n.n.	n.n.	34,3
21	Pinot Blanc Lage	16,3	n.n.	0,4	1,4	u.B.	12,8	n.n.	0,2	n.n.	31,0
22	Pinot Gris "Linea"	18,6	n.n.	0,3	8,1	u.B.	17,5	n.n.	n.n.	n.n.	44,5
23	Grauburgunder "Saziani"	13,2	n.n.	0,1	3,8	0,1	11,9	n.n.	0,4	n.n.	29,6
24	Morillon "Moarfeitl"	14,7	n.n.	0,1	3,0	0,1	13,8	n.n.	0,2	n.n.	31,9
25	Sauvignon "Moarfeitl Reserve"	19,7	n.n.	u.B.	2,6	u.B.	21,7	n.n.	0,2	n.n.	44,2
26*	Königsberg (50%ZW, 50% St.L.)	25,5	n.n.	u.B.	8,0	0,2	17,0	n.n.	0,1	n.n.	50,8
27*	St. Laurent	25,1	n.n.	0,1	6,3	u.B.	11,7	n.n.	n.n.	n.n.	43,2
28	Chardonnay "Selection"	15,3	n.n.	0,1	0,9	u.B.	3,8	u.n.	u.B.	n.n.	20,1
29**	Schilcher Barrique	18,7	n.n.	0,1	0,5	n.n.	7,1	n.n.	0,3	n.n.	26,7
30	Morillon	15,0	n.n.	0,3	1,0	u.B.	6,9	n.n.	0,5	n.n.	23,7

31	Pinot Klinzel	18,4	n.n.	0,4	12,1	0,1	10,4	n.n.	n.n.	n.n.	41,3
32	Eruption	25,4	n.n.	0,7	2,3	0,1	5,1	n.n.	n.n.	n.n.	33,6
33*	Roter Koasasteffl	34,0	n.n.	0,7	15,2	u.B.	15,0	n.n.	n.n.	n.n.	64,9
34	Chardonnay "Selection"	11,8	n.n.	0,2	17,7	0,2	4,3	n.n.	n.n.	n.n.	34,2
35	Chardonnay "Engabrunner Hüttweg"	14,2	n.n.	0,5	1,0	u.B.	7,0	n.n.	n.n.	n.n.	22,7
36	Morillon "Nussberg"	14,5	n.n.	0,1	5,1	u.B.	5,9	n.n.	n.n.	n.n.	25,6
37	Weißburgunder mit BSA	14,6	n.n.	0,1	10,0	0,4	7,8	2,3	1,1	n.n.	36,3
38	Weißburgunder ohne BSA	14,5	n.n.	u.B.	1,0	u.B.	4,8	n.n.	1,0	n.n.	21,3
39	Traminer mit BSA	18,7	n.n.	0,6	10,1	0,5	22,8	7,8	1,6	n.n.	61,6
40	Traminer ohne BSA	19,5	n.n.	0,6	2,2	0,1	11,4	n.n.	1,3	n.n.	35,1
41	Morillon mit BSA	18,1	n.n.	0,2	6,3	0,7	25,4	3,4	1,7	n.n.	55,7
42	Morillon ohne BSA	15,8	n.n.	u.B.	1,7	u.B.	9,2	n.n.	1,7	n.n.	28,4
43	Morillon "Katzianer"	16,2	n.n.	0,1	1,7	0,1	5,7	n.n.	0,1	n.n.	23,8
44	Weißburgunder "Katzianer"	15,3	n.n.	u.B.	1,7	u.B.	3,9	n.n.	n.n.	n.n.	20,9
45	Ruländer "Katzianer"	18,6	n.n.	0,3	1,7	u.B.	3,1	n.n.	n.n.	n.n.	23,8
46	Chardonnay	17,5	n.n.	0,2	2,7	u.B.	11,2	n.n.	0,7	n.n.	32,3
47	Bianco	15,6	n.n.	0,3	4,6	u.B.	13,2	n.n.	n.n.	n.n.	33,7
48	Pinot Grigio	13,5	n.n.	n.n.	4,8	0,2	9,2	0,5	0,1	n.n.	28,1
49	Chardonnay	14,0	n.n.	0,1	1,3	n.n.	13,9	n.n.	0,3	n.n.	29,6
50	Sauvignon	24,7	n.n.	0,8	5,7	n.n.	14,2	n.n.	0,3	n.n.	45,7
51	Chardonnay	17,7	n.n.	n.n.	3,1	0,1	10,6	n.n.	0,2	n.n.	31,7
52	Chardonnay	15,7	n.n.	0,1	2,5	u.B.	16,5	n.n.	n.n.	n.n.	34,8
53	Sauvignon	10,6	n.n.	n.n.	1,8	u.B.	3,7	n.n.	n.n.	n.n.	16,2
54	Chardonnay	16,1	n.n.	u.B.	1,9	u.B.	9,6	n.n.	0,5	n.n.	28,1
55	Pinot bianco	14,1	n.n.	u.B.	2,5	n.n.	13,7	n.n.	0,3	n.n.	30,6
56	Pinot Grigio	15,1	n.n.	u.B.	2,6	u.B.	15,6	n.n.	0,2	n.n.	33,5
57	Sauvignon	15,4	n.n.	n.n.	5,2	n.n.	9,1	n.n.	0,3	n.n.	30,0
58	Tocai Friulani	11,8	n.n.	n.n.	2,3	n.n.	18,8	1,3	0,6	n.n.	34,8
59	Collio bianco	13,8	n.n.	0,1	4,3	0,1	15,4	0,4	0,6	n.n.	34,6

n.n.: nicht nachweisbar; u.B.: unter der Bestimmungsgrenze

Querunterteilungen kennzeichnen unterschiedliche Weingüter

* Rotwein; **Roséwein

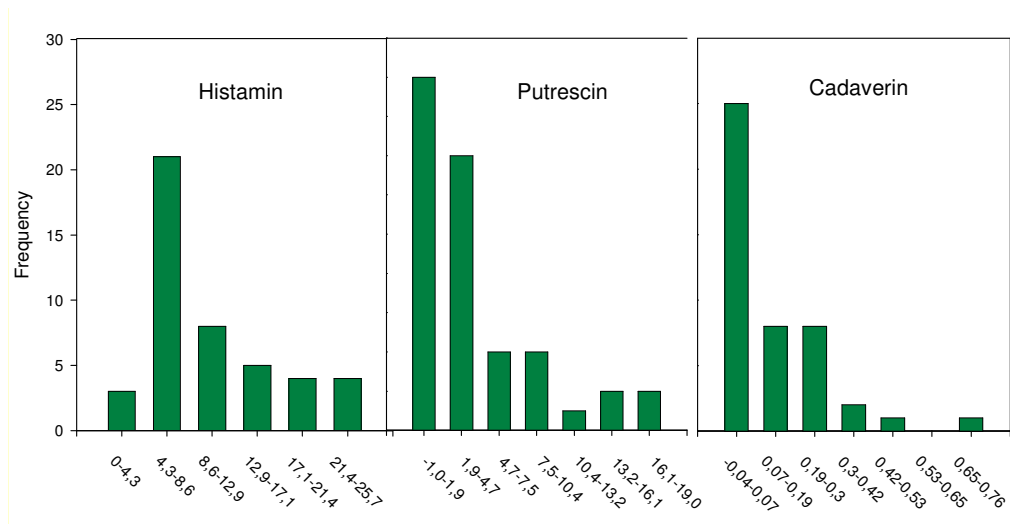


Abb.19: Häufigkeitsverteilung von Histamin, Putrescin, Cadaverin in allen Weinproben

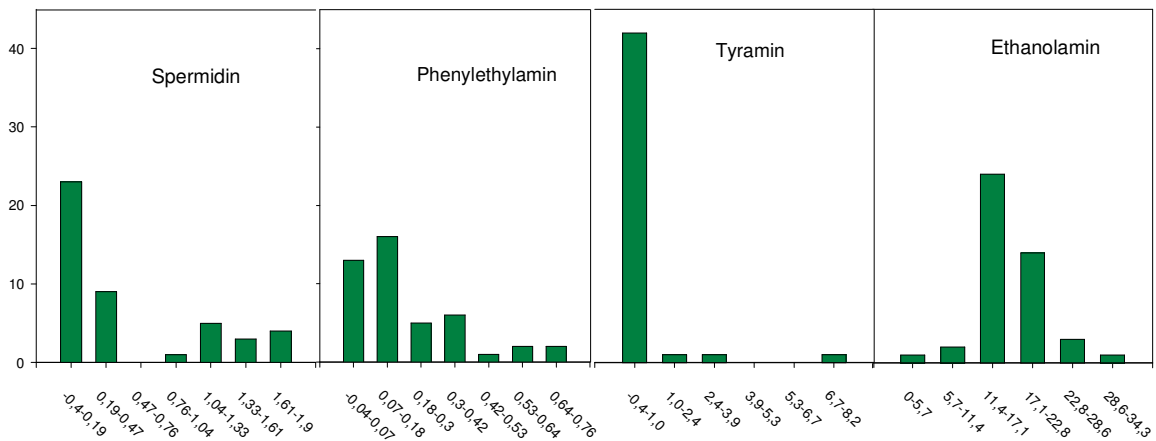


Abb.20: Häufigkeitsverteilung von Spermidin, Phenylethylamin, Tyramin, Ethanolamin in allen Weinproben

Eine Häufigkeitsverteilung von Daten entsteht, wenn die ermittelten Zahlenwerte arithmetisch geordnet werden und angegeben wird, wie häufig jeder Wert innerhalb der gewählten Klassen vorkommt.

Tabelle 6 fasst die gemessenen Gehalte an biogenen Aminen zusammen. Es ist zu erkennen, dass Tryptamin und Spermin in keiner Probe in detektierbarer Konzentration gefunden werden konnte. Insgesamt zeigen sich mit wenigen Ausnahmen sehr ähnliche Gehalte an Ethanolamin, β -Phenylethylamin und Cadaverin. Tyramin konnte nur in vereinzelt Proben detektiert werden. Die größten Unterschiede unter den Proben zeigten sich bei Putrescin und Histamin.

In der Beschreibung der Proben wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Herstellungsart des Weines einen wesentlichen Einfluss auf die Gehalte an biogenen Aminen haben kann. Die

Proben unterscheiden sich einerseits dadurch, ob ein biologischer Säureabbau durchgeführt wurde oder nicht und andererseits in der Art der Lagerung. Die Reifung des Weines erfolgte entweder über 8 – 12 Monate in Holzfässern oder über zirka drei Monate in Edelstahlfässern. Um herauszufinden, ob sich die Gehalte der Amine in den Weinen aufgrund dieser unterschiedlichen Prozessierung unterscheiden, wurden die Daten statistisch ausgewertet. Bei keiner dieser statistischen Analysen konnte der Mittelwert herangezogen werden da sich keine Normalverteilung zeigte. Daher erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines Mann-Whitney (Wilcoxon) W Tests, wobei die beiden Mediane verglichen werden. Der Median ist derjenige Wert, welcher die nach Größe geordnete Datenreihe halbiert. Wenn der dabei errechnete p-Wert kleiner als 0,05 ist, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Medianen bei einem Konfidenzintervall von 95% [33]. Alle statistischen Auswertungen erfolgten Software unterstützt unter Verwendung von Statgraphics *plus* Version 3.0.

Die folgenden Box-and-Whisker Plots zeigen die Ergebnisse der statistischen Auswertung nach dem Kriterium mit bzw. ohne BSA.

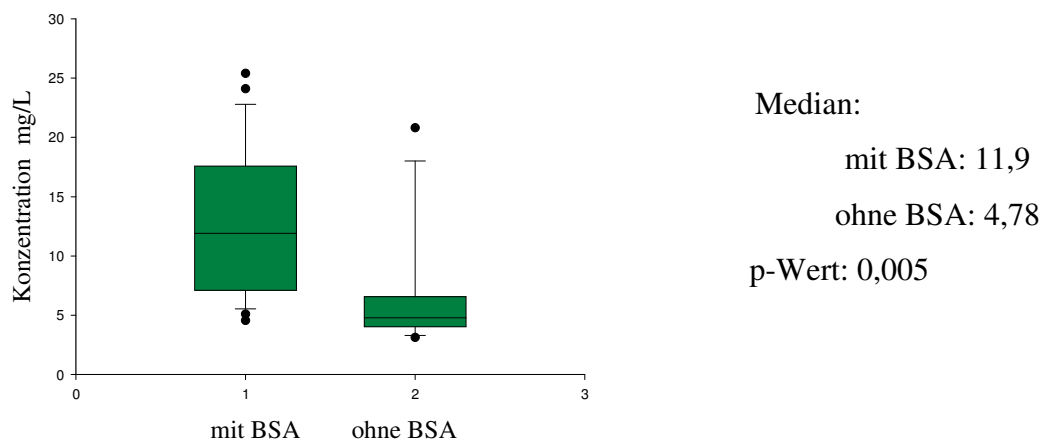
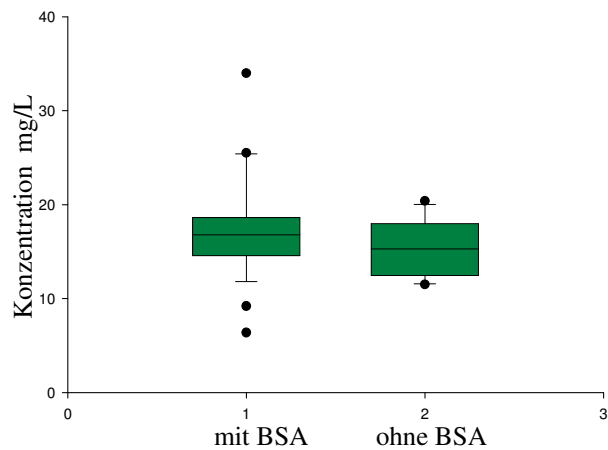
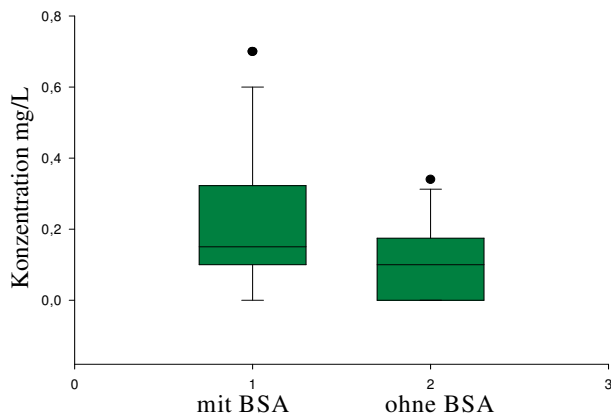


Abb.21: Statistische Auswertung von Histamin (Mann-Whitney W Test, Signifikanzniveau: 0,05) nach dem Kriterium mit/ohne BSA



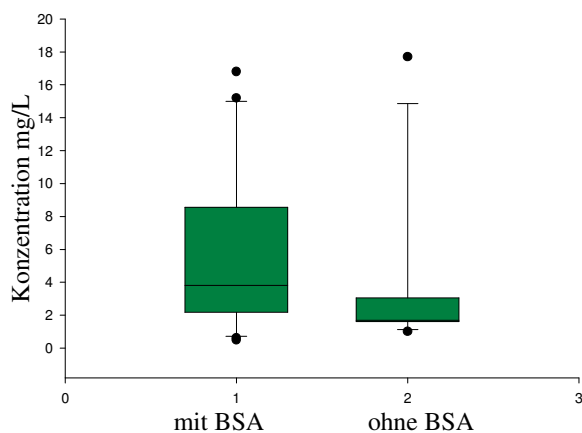
Median:
 mit BSA: 16,8
 ohne BSA: 15,3
 p-Wert: 0,19

Abb.22: Statistische Auswertung von Ethanolamin (Mann-Whitney W Test, Signifikanzniveau: 0,05) nach dem Kriterium mit/ohne BSA



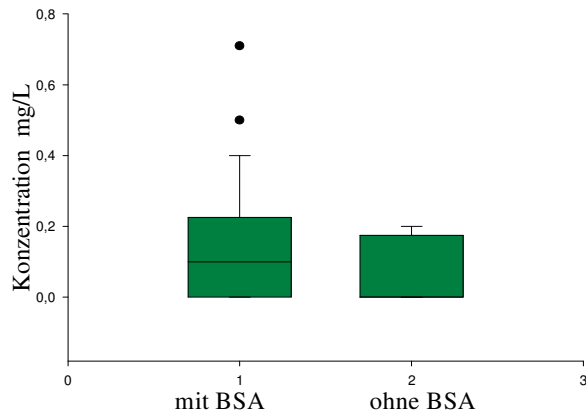
Median:
 mit BSA: 0,15
 ohne BSA: 0,10
 p-Wert: 0,76

Abb.23: Statistische Auswertung von β -Phenylethylamin (Mann-Whitney W Test, Signifikanzniveau: 0,05) nach dem Kriterium mit/ohne BSA



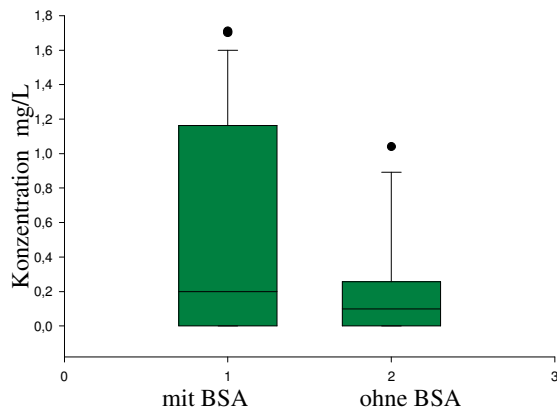
Median:
 mit BSA: 3,81
 ohne BSA: 1,70
 p-Wert: 0,10

Abb.24: Statistische Auswertung von Putrescin (Mann-Whitney W Test, Signifikanzniveau 0,05) nach dem Kriterium mit/ohne BSA



Median:
 mit BSA: 0,10
 ohne BSA: 0,00
 p-Wert: 0,23

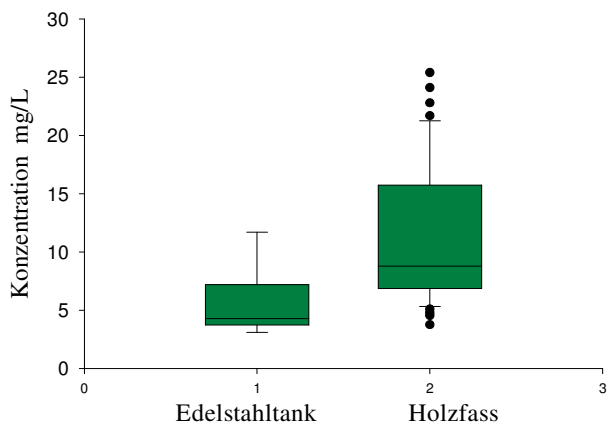
Abb.25: Statistische Auswertung von Cadaverin (Mann-Withney W Test, Signifikanzniveau 0,05) nach dem Kriterium mit/ohne BSA



Median:
 mit BSA: 0,20
 ohne BSA: 0,10
 p-Wert: 0,18

Abb.26: Statistische Auswertung von Spermidin (Mann-Withney W Test, Signifikanzniveau 0,05) nach dem Kriterium mit/ohne BSA

Der Vergleich der Lagerungsart, Edelstahltank oder Holzfass, liefert folgende Ergebnisse:



Median:
 Edelstahltank: 8,80
 Holzfass: 4,30
 p-Wert: 0,007

Abb.27: Statistische Auswertung von Histamin (Mann-Withney W Test, Signifikanzniveau 0,05) nach dem Kriterium Edelstahltank/Holzfass

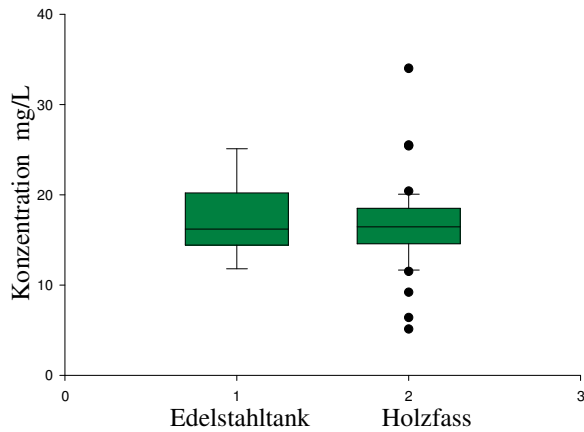


Abb.28: Statistische Auswertung von Ethanolamin (Mann-Withney W Test, Signifikanzniveau 0,05) nach dem Kriterium Edelstahltank/Holzfass

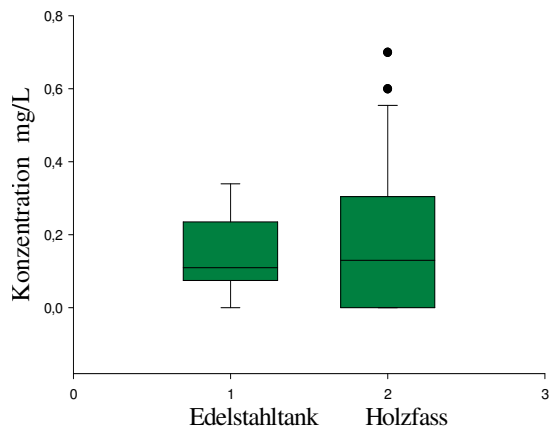


Abb.29: Statistische Auswertung von β -Phenylethylamin (Mann-Withney W Test, Signifikanzniveau 0,05) nach dem Kriterium Edelstahltank/Holzfass

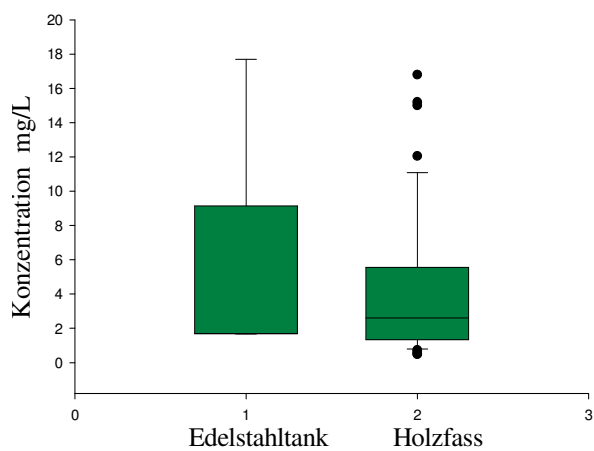
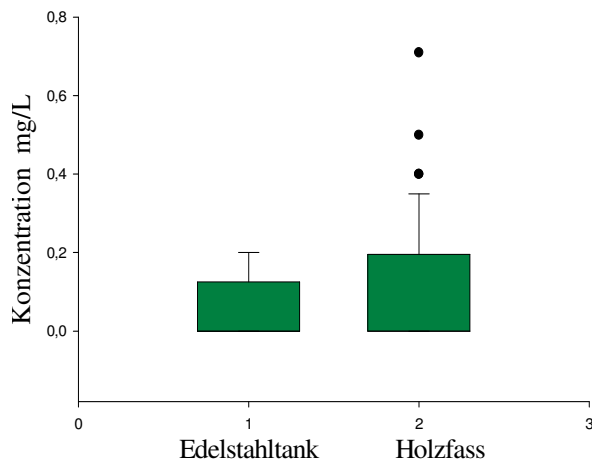


Abb.30: Statistische Auswertung von Putrescin (Mann-Withney W Test, Signifikanzniveau 0,05) nach dem Kriterium Edelstahltank/Holzfass



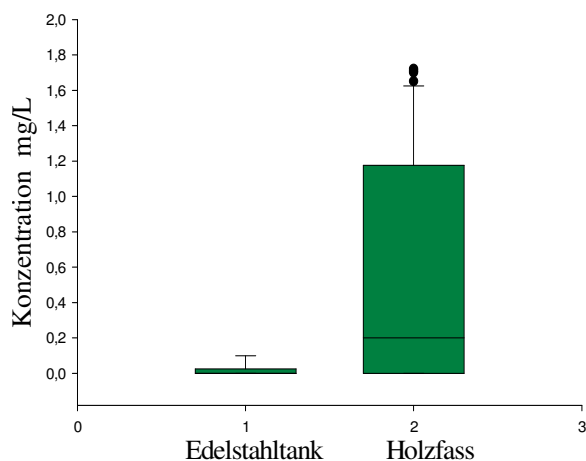
Median:

Edelstahltank: 0,0

Holzfass: 0,0

Nullhypothese

Abb.31: Statistische Auswertung von Cadaverin (Mann-Withney W Test, Signifikanzniveau 0,05) nach dem Kriterium Edelstahltank/Holzfass



Median:

Edelstahltank: 0,0

Holzfass: 0,20

p-Wert: 0,02

Abb.32: Statistische Auswertung von Spermidin (Mann-Withney W Test, Signifikanzniveau 0,05) nach dem Kriterium Edelstahltank/Holzfass

Die unterschiedlich langen Whiskers (durch Ähnlichkeit zu Katzenbarthaaren) an der Box zeigen, dass keine symmetrische Verteilung (Normalverteilung) der Daten vorhanden ist. Weiters müssten bei einer Normalverteilung Mittelwert und Median identisch sein [33].

Im Vergleich mit/ohne BSA zeigte sich nur bei Histamin ein statistisch signifikanter Unterschied. Die Gegenüberstellung der beiden Ausbauarten ergibt für Histamin und Spermidin einen signifikanten Unterschied. Dies bedeutet, dass ein biologischer Säureabbau und eine Lagerung im Holzfass zu signifikant höheren Gehalten an Histamin führen. Alle anderen Amine zeigen diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied.

Die von einem der Winzer zur Verfügung gestellten Proben dreier unterschiedlicher Sorten, wobei von jeder Sorte ein Ansatz mit und ein zweiter ohne BSA durchgeführt wurde, lieferte folgendes Ergebnis.

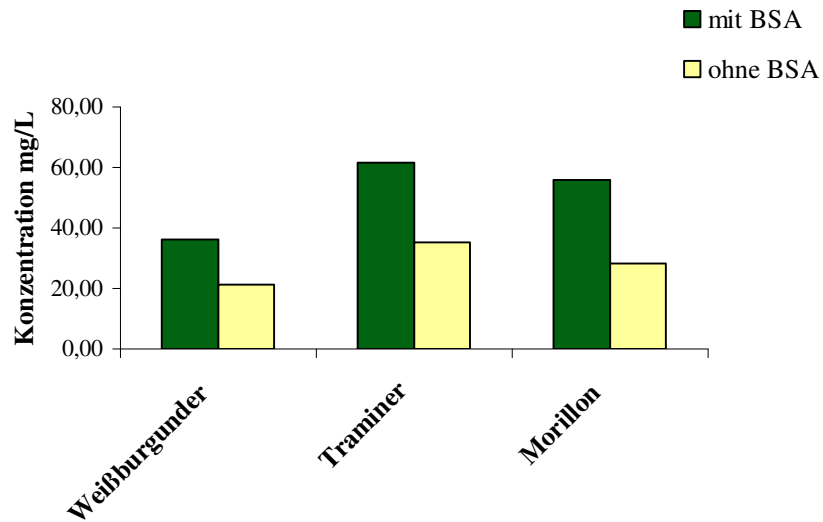


Abb.33: Gesamtamingehalt im Vergleich mit/ohne BSA

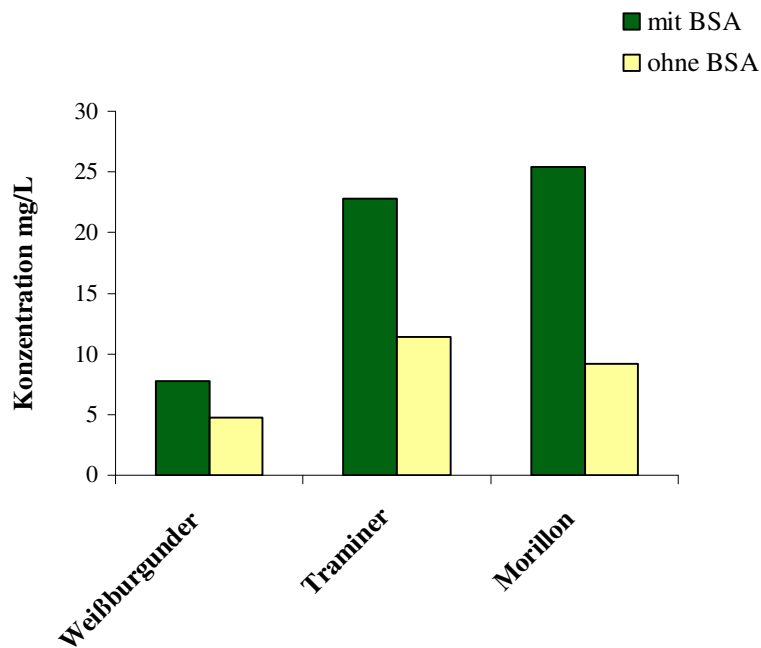


Abb.34: Histamingehalte im Vergleich mit/ohne BSA

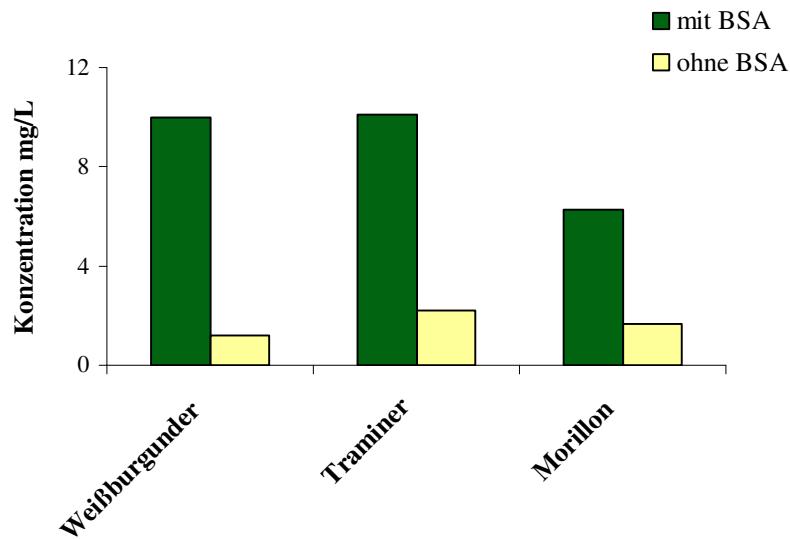
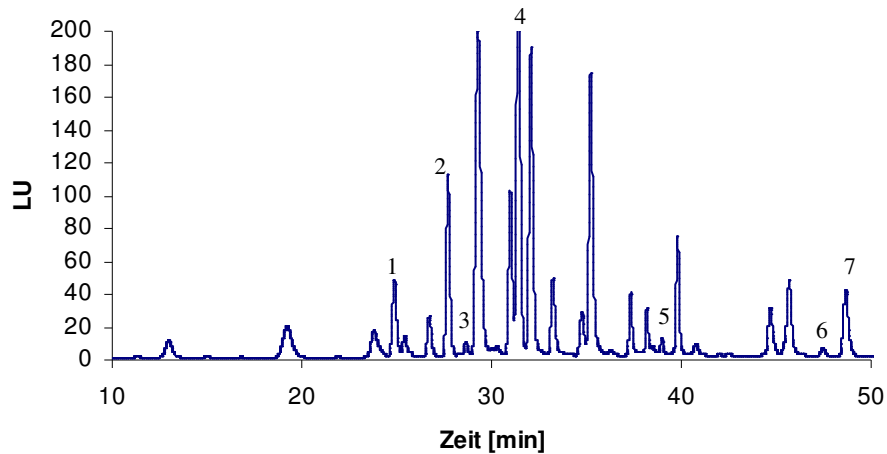


Abb.35: Putrescingehalte im Vergleich mit/ohne BSA

Diese Grafiken weisen darauf hin, dass ein biologischer Säureabbau die Gehalte einiger Amine steigern kann. Neben Putrescin und Histamin sind auch die Tyramingehalte in diesen Proben interessant. In allen drei Proben mit BSA konnte Tyramin detektiert werden, in denen ohne BSA jedoch nicht. Gleichzeitig sind diese drei Proben auch die einzigen steirischen Weinproben in denen das biogene Amin Tyramin nachgewiesen werden konnte. Alle übrigen Amine zeigen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Ansätzen. Die Gehalte sind in Tabelle 6 zu finden (Proben 37 – 42).

6.2 Ergebnisse des BSA-Versuchs

Der BSA-Versuch soll zeigen, wie sich die Gehalte an biogenen Aminen während der Hauptgärung und der anschließenden malolaktischen Gärung (BSA) verändern. Die genaue Versuchsbeschreibung befindet sich unter 5.2. In diesen Proben erfolgte auch die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung.



1= Serin, 2=Glutamin, 3=Histidin, 4=Arginin, 5=Tyrosin, 6=Lysin, 7=Phenylalanin

Abb.36: Chromatogramm eines Gäransatzes zur Aminosäurebestimmung

Die anschließenden Grafiken zeigen den Bildungsverlauf der einzelnen Amine während der Gärung in den unterschiedlichen Versuchsvarianten.

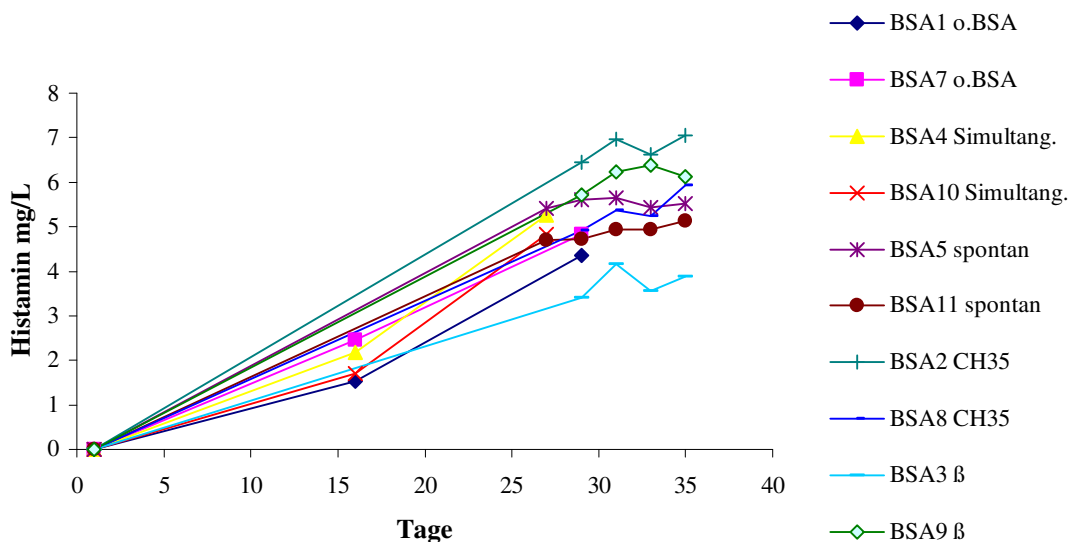


Abb.37: Histaminbildung der einzelnen Ansätze über die Gärdauer

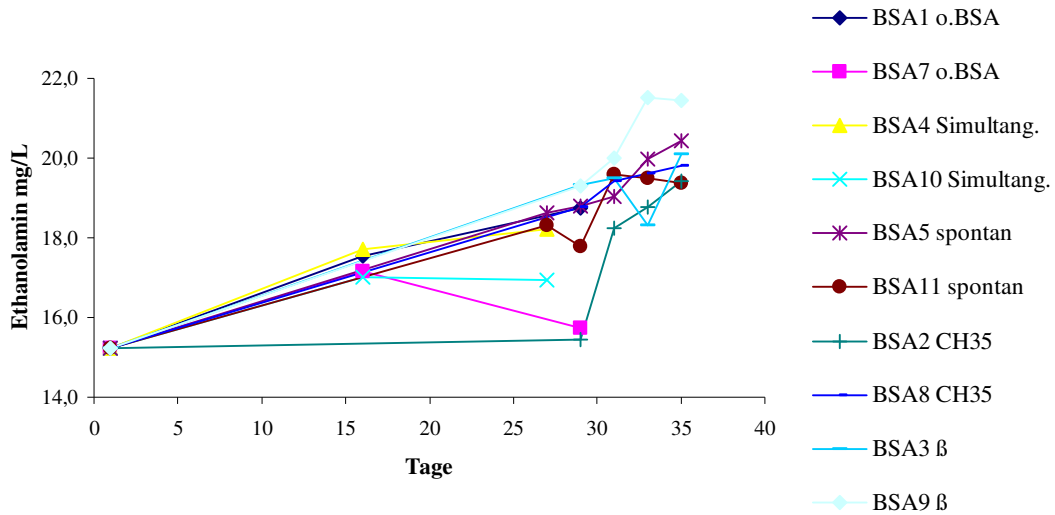


Abb.38: Ethanolaminbildung der einzelnen Ansätze über die Gärdauer

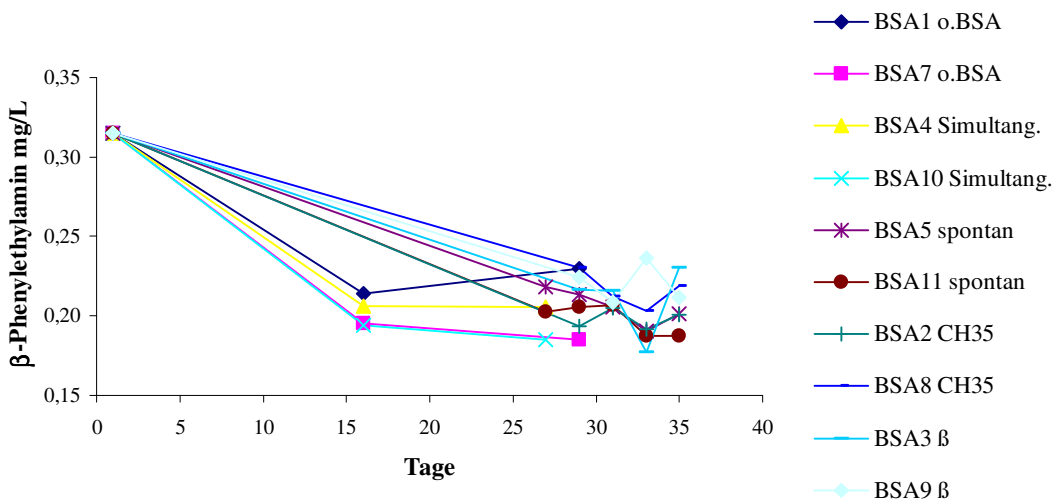


Abb.39: β -Phenylethylaminbildung der einzelnen Ansätze über die Gärdauer

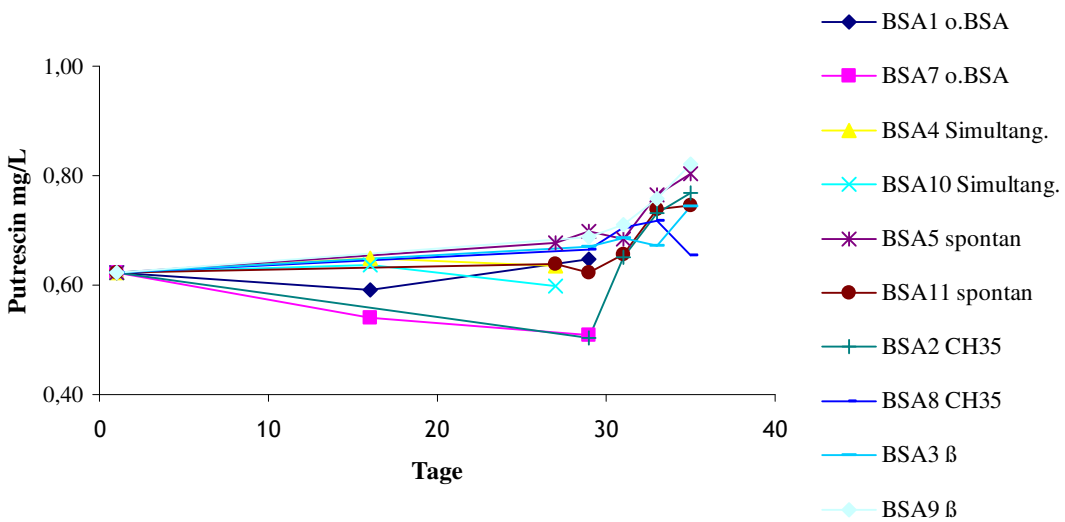


Abb.40: Putrescinbildung der einzelnen Ansätze über die Gärdauer

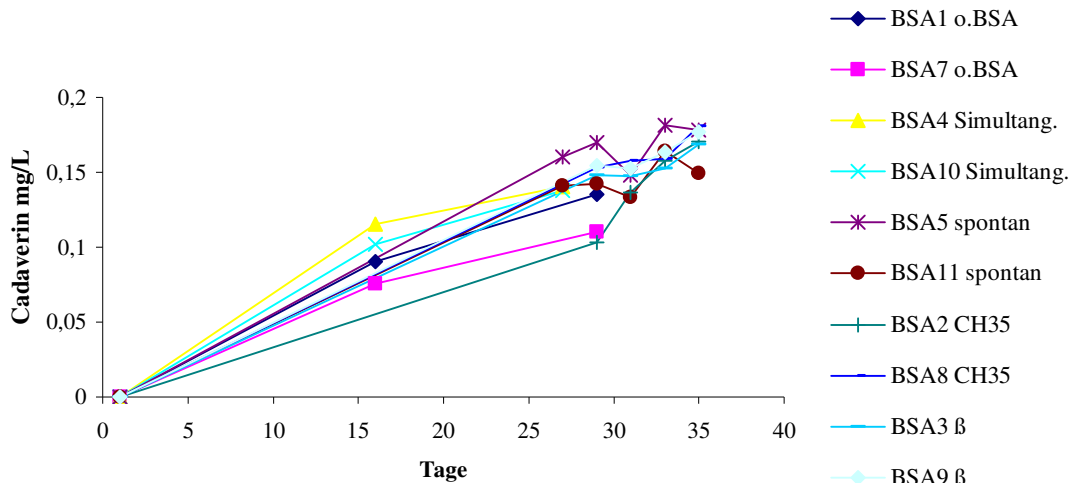


Abb. 41: Cadaverinbildung der einzelnen Ansätze über die Gärdauer

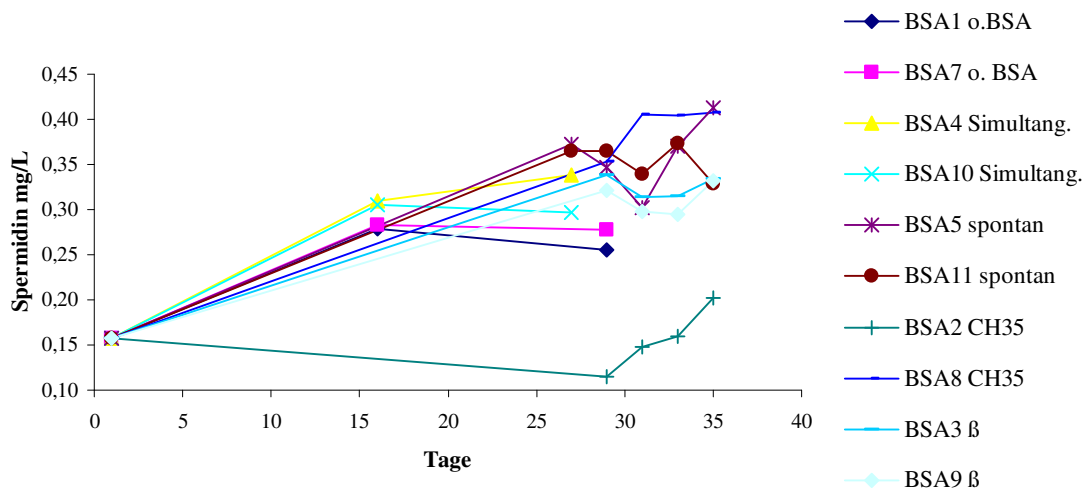


Abb.42: Spermidinbildung der einzelnen Ansätze über die Gärdauer

Aus den einzelnen Grafiken ist einerseits zu erkennen, dass einige der Amine bereits im Ausgangsmaterial, dem frisch gepressten Traubenmost, vorhanden sind und andererseits, dass teilweise Amine während der Gärung abnehmen, andere wiederum zunehmen.

Indem Aminosäuren Vorstufen von Aminen sind, muss eine Zunahme der Aminkonzentration eine Abnahme der Aminosäurekonzentration bedingen.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Verlauf der Aminkonzentration gegenübergestellt der Aminosäurekonzentration der jeweiligen Versuchsvariante.

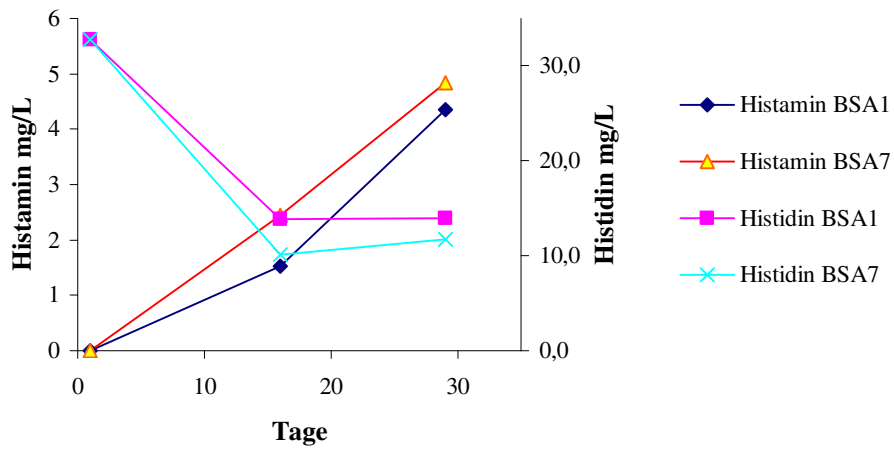


Abb.43. Verlauf Histamin/Histidin; Kontrollproben ohne angesetztem BSA

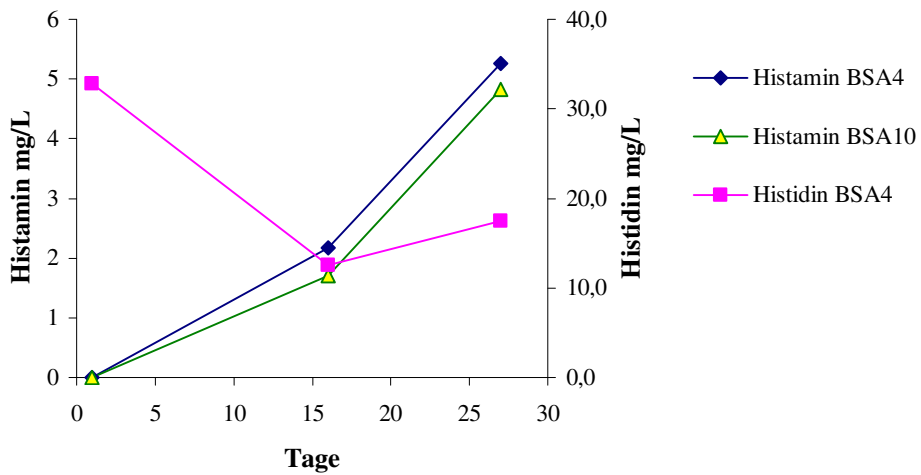


Abb.44: Verlauf Histamin/Histidin; Simultangärvariante

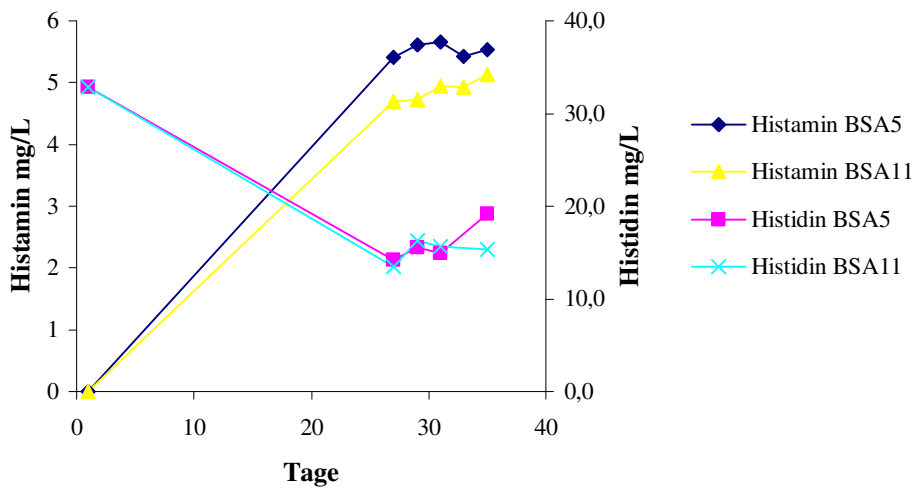


Abb.45: Verlauf Histamin/Histidin; spontaner BSA

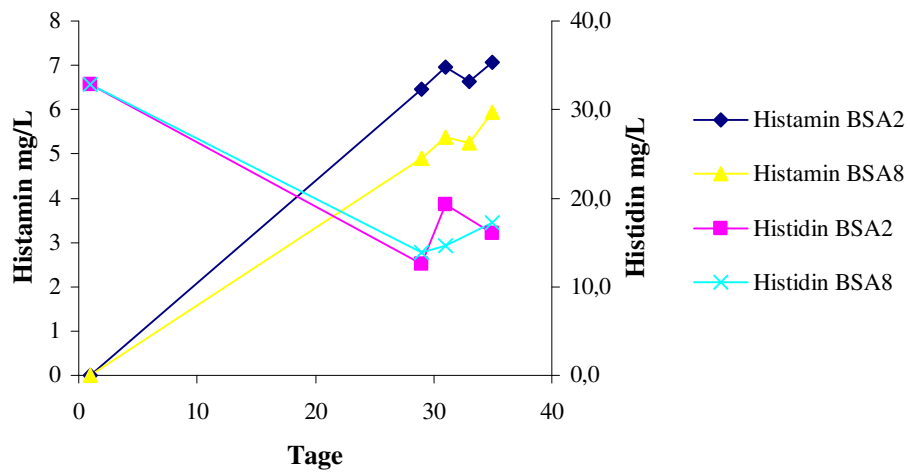


Abb.46: Verlauf Histamin/Histidin; Stamm CH35

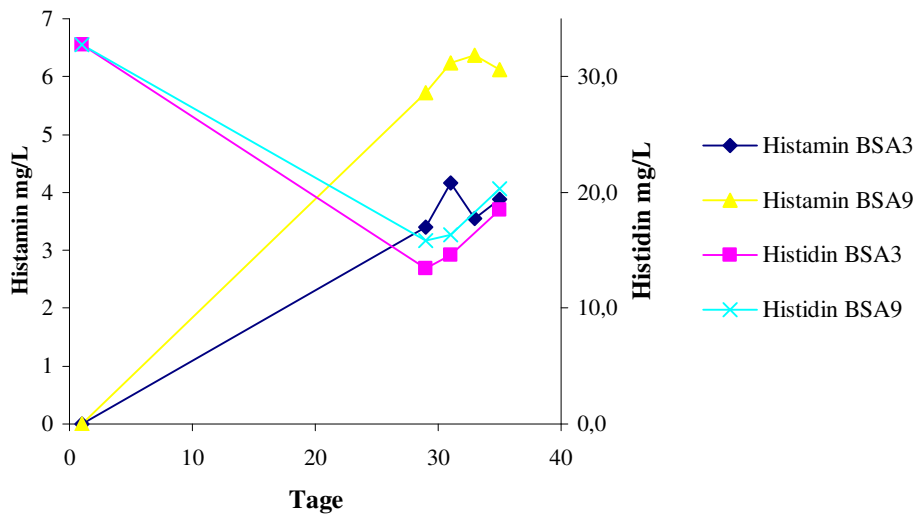


Abb.47: Verlauf Histamin/Histidin; Stamm β

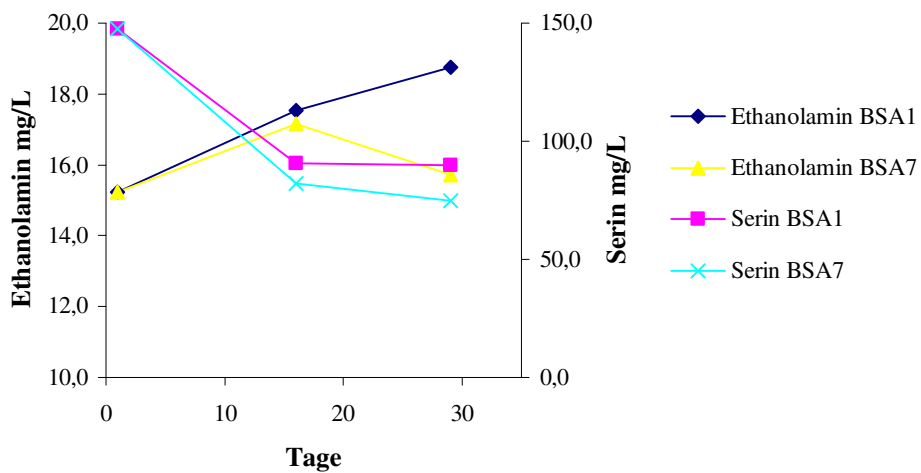


Abb.48: Verlauf Ethanolamin/Serin; Kontrollprobe ohne angesetztem BSA

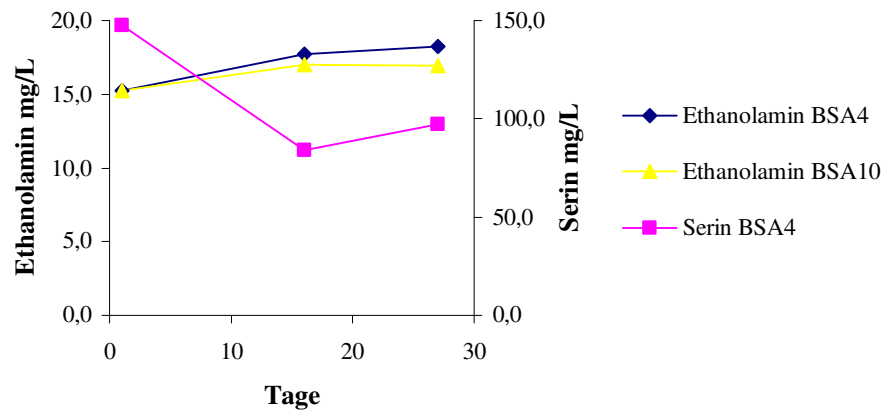


Abb.49: Verlauf Ethanolamin/Serin; Simultangärvariante

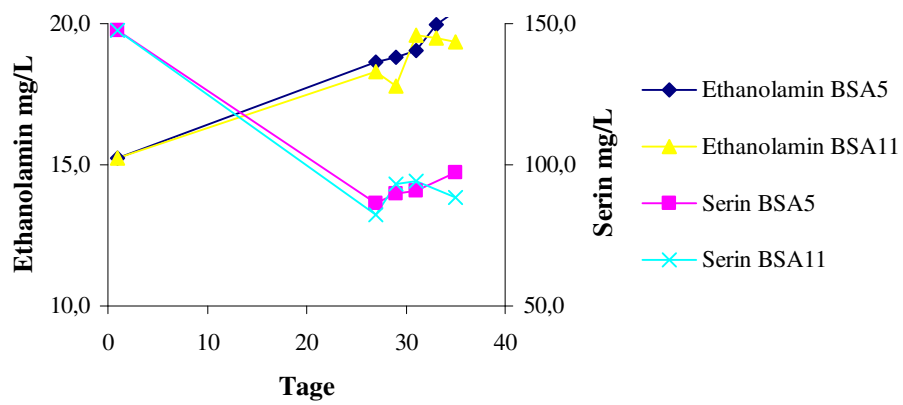


Abb.50: Verlauf Ethanolamin/Serin; spontaner BSA

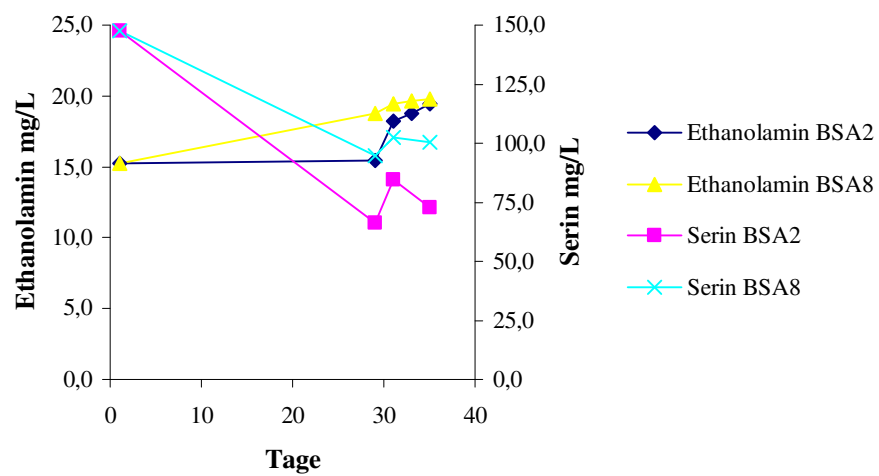


Abb.51: Verlauf Ethanolamin/Serin; spontaner BSA

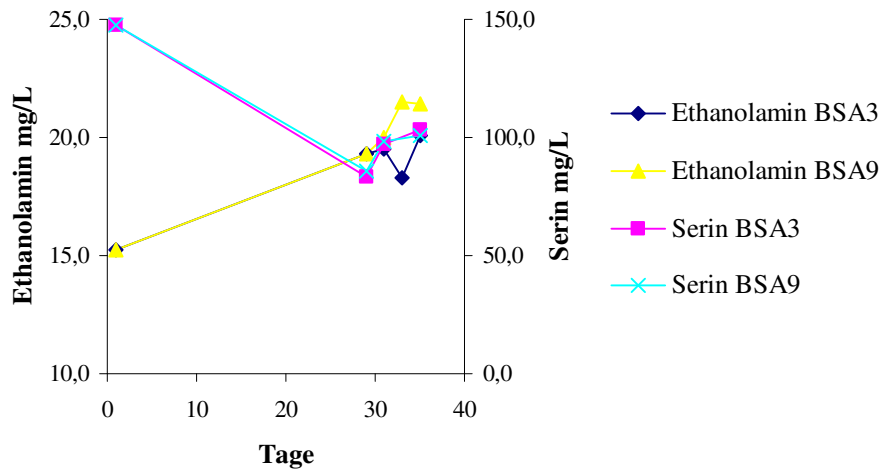


Abb.52: Verlauf Ethanolamin/Serin; Stamm β

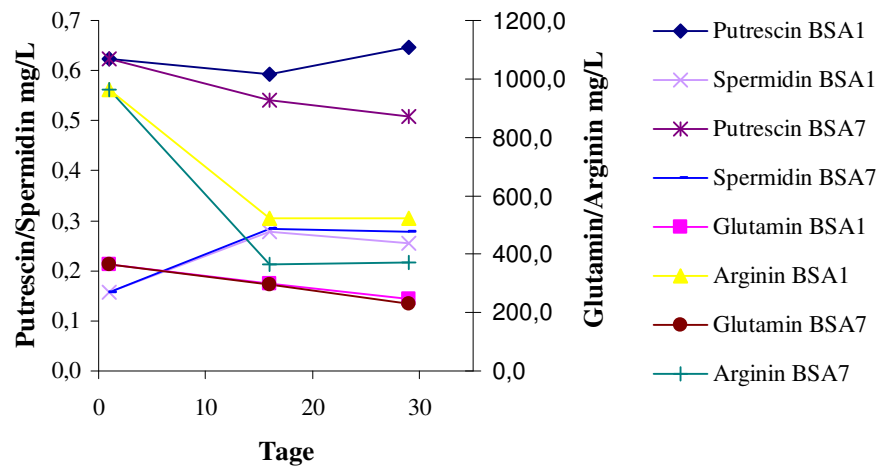


Abb.53: Verlauf Putrescin, Spermidin/ Glutamin, Arginin; Kontrollprobe ohne angesetztem BSA

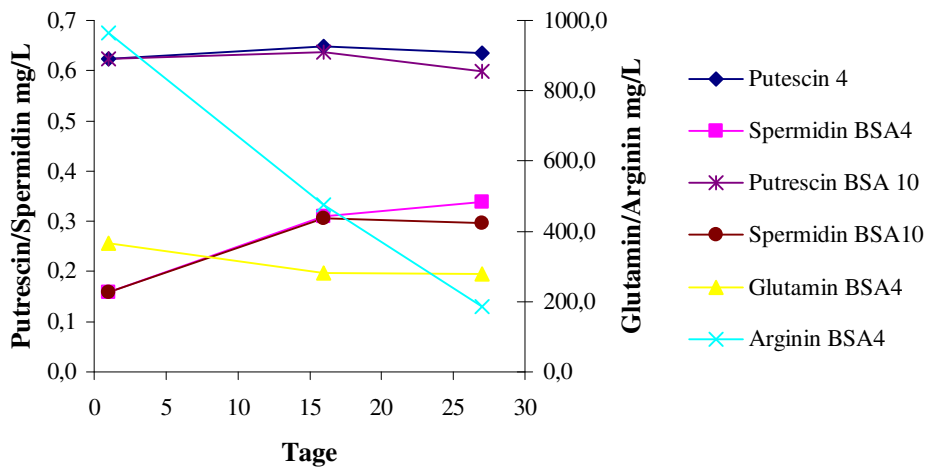


Abb.54: Verlauf Putrescin, Spermidin/Glutamin, Arginin; Simultangärvariante

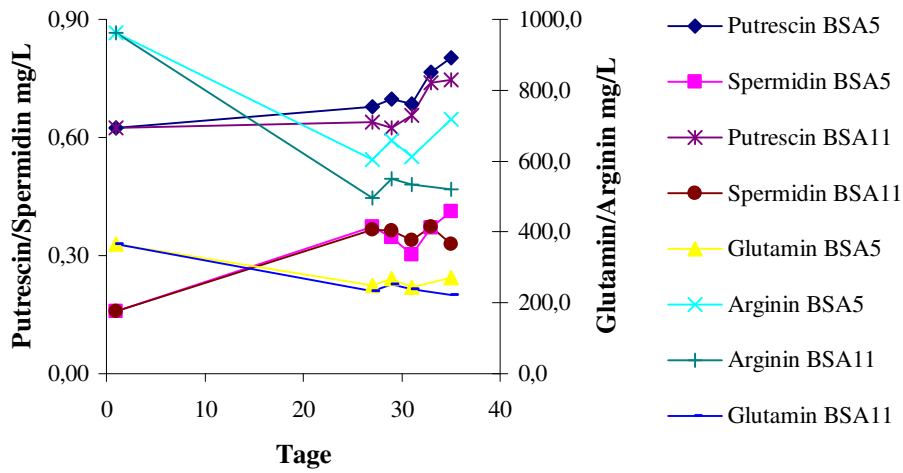


Abb.55: Verlauf Putrescin, Spermidin/Glutamin, Arginin; spontaner BSA

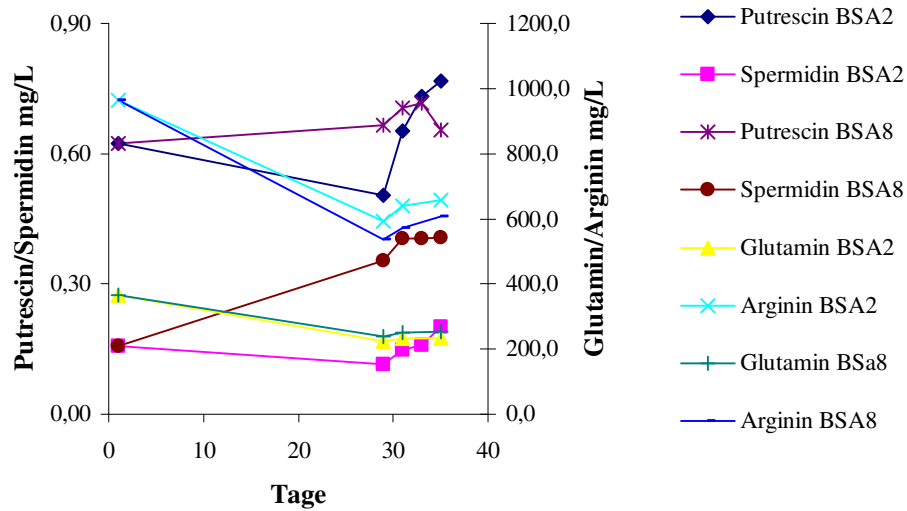


Abb.56: Verlauf Putrescin, Spermidin/Glutamin, Arginin; Stamm CH35

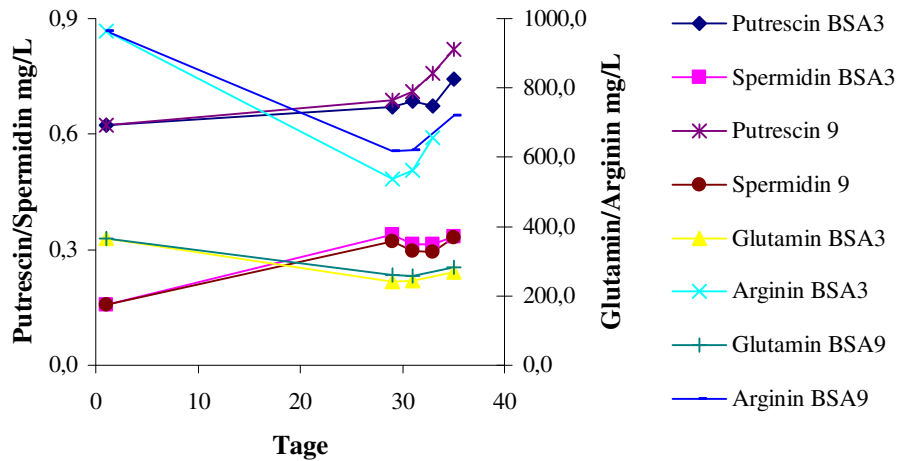


Abb.57: Verlauf Putrescin, Spermidin/Glutamin, Arginin; Stamm β

Die Aminosäuregehalte verändern sich im beobachteten Zeitraum teilweise nur sehr gering, bzw. bewegen sich in der Schwankungsbreite der Messungen. Vor allem innerhalb der wenigen Tage an denen der biologische Säureabbau statt findet ist keine deutliche Konzentrationsänderung zu erkennen. Aus den Grafiken ist zu erkennen, dass einige der Aminosäuregehalte zuerst abnehmen, dann wiederum steigen. Dies erklärt sich durch die Lyse der Hefezellen am Ende der Hauptgärung.

Die folgende Grafik zeigt die Aminosäurekonzentrationen im Ausgangsmost, am Ende der Hauptgärung und nach dem biologischen Säureabbau.

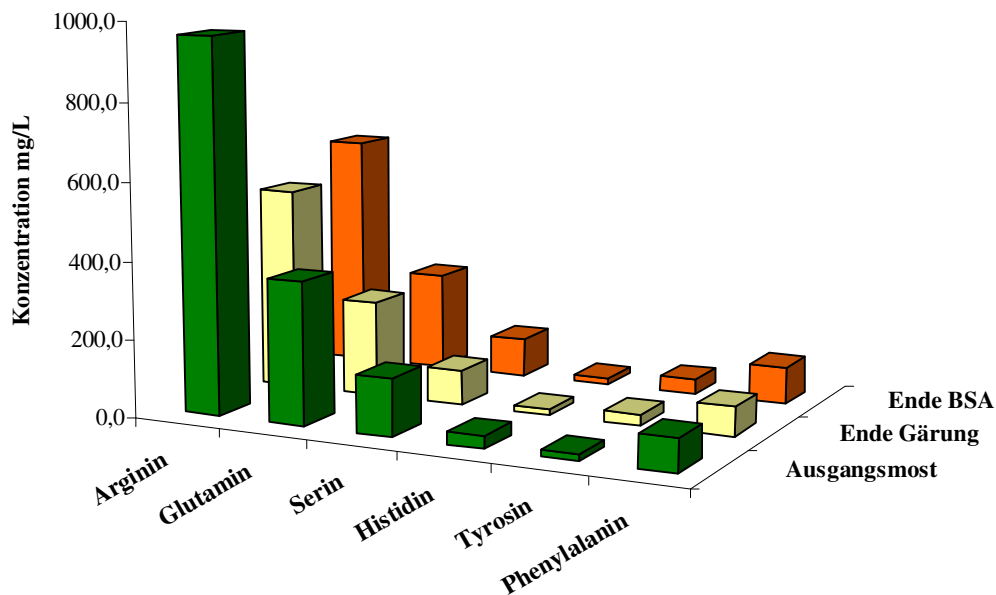


Abb.58: Verlauf der Aminosäuregehalte über die Versuchsdauer

7. Diskussion

Weinproben

Die Analyse der Amingehalte in den Weinproben liefert im Allgemeinen Ergebnisse die mit den Daten der bereits vorhandenen Literatur sehr gut übereinstimmen. Der Vergleich der einzelnen Amine in den Weinproben zeigt teilweise ein sehr unterschiedliches Ergebnis. Einfluss auf den Gehalt an BA haben nicht nur der Herstellungsprozess sondern auch Faktoren wie Klima, Nährstoffbedingungen und Sorte. Vor allem die Konzentration an Polyaminen ist davon abhängig.

Ethanolamin konnte in allen untersuchten Weinproben bestimmt werden. Dabei bewegen sich die detektierten Konzentrationen in einem Bereich von 5,1 – 25,4 mg/L in Weißweinen, im Rotwein mit der Probennummer 33 konnten 34 mg/L detektiert werden. Hohe Gehalte an Ethanolamin findet man bereits im Ausgangmost und die vorhandenen Konzentrationen ändern sich auch während der Prozessierung und anschließenden Reifung des Weines nur geringfügig [6]. Da Ethanolamin weder vasoaktive noch psychoaktive Eigenschaften besitzt stellen die Konzentrationen kein Gesundheitsrisiko dar.

Tryptamin konnte in keiner der Weinproben gefunden werden. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von *S. Bover-Cid et al.* [7] überein, die in 40 untersuchten Weinen Tryptamin ebenfalls nicht detektieren konnten.

Neben Ethanolamin konnte auch noch Putrescin und Histamin in allen 59 Proben detektiert werden. Die Konzentrationen von Putrescin liegen zwischen 0,5 – 17,7 mg/L. Die Quellen für Putrescin im Wein können sehr unterschiedlich sein und sind auch oft sehr schwierig zu unterscheiden. Es kann einerseits vom Rohmaterial als natürlicher Bestandteil der Pflanze stammen und andererseits während der Weinherstellung entstehen. Die Bildung während der Weinprozessierung geht auf die mikrobielle Decarboxylierung von Ornithin zurück. *M.V. Moreno-Arribas et al.* [22] konnten in ihrer Studie die Bildung von Putrescin aus Ornithin vor allem auf *Lactobacillus buchneri* zurückführen. Grundsätzlich ist in Rotweinen ein höherer Gehalt an Putrescin zu erwarten als in Weißweinen. Die Vinifizierung von Rotwein erfolgt unter Anwesenheit der Beerenhäute. Putrescin, welches sich darin befindet, kann in den Most abgegeben werden. In dieser Arbeit wurden nur drei Rotweine analysiert, wobei diese aber keine höheren Gehalte an Putrescin aufwiesen als Weißweine.

Hohe Gehalte an Putrescin in Wein werden oft mit einer schlechten Hygiene, in der Verarbeitung und im Keller, in Verbindung gebracht. Die Verwendung von Putrescin als

Qualitätsindikator kann sehr gut auf Fisch und Fleisch angewendet werden, jedoch nicht für Wein da hier die Herkunft mannigfaltig sein kann [7].

Histamin, das vom gesundheitlichen Aspekt bedenklichste Amin, konnte ebenfalls in allen Proben detektiert werden, teilweise in sehr hohen Konzentrationen. Der höchste gefundene Wert liegt bei 25,4 mg/L. Im Ausgangsmost kommt Histamin wenn überhaupt nur in sehr geringen Mengen vor. Die Bildung erfolgt einerseits während der Hauptgärung und des anschließenden BSA und andererseits auch in der Lagerzeit. Unter Verwendung selektierter Mikroorganismen, welche keine Histidindecarboxylase (HDC) besitzen, versucht man die Konzentrationen im Wein zu reduzieren. Durch Bakterien auf den Trauben und durch die Mikroflora im Weinkeller kommt es aber immer zu Kontaminationen mit Histidindecarboxylaseaktiven Milchsäurebakterien. Neben den Milchsäurebakterien können auch einige „nicht-Saccharomyces“ Hefen, die sich in frühen Phasen der alkoholischen Gärung vermehren, Histamin bis zu Konzentrationen von 8,3 mg/L produzieren [6]. Eine wesentliche Rolle bei der Bildung von Histamin spielt die Lagerung der Weine. Wie bereits im allgemeinen Teil beschrieben, können Mikroorganismen mit einer HDC auch in nährstoffarmen Medien überleben, da die Decarboxylierung von Histidin die notwendige Energie dafür liefert. Diese Energie reicht zwar nicht für ein vermehrtes Zellwachstum, jedoch überlebt eine Population, ist metabolisch aktiv und produziert Histamin [24]. Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten bestätigt genau diesen Befund. Es zeigt sich, dass Weine mit einem durchgeführten BSA und einer Lagerung im Holzfass signifikant höhere Gehalte an Histamin haben als Weine ohne BSA und Reifung in Edelstahltanks. Die Lagerung in Edelstahltanks erfolgt ungefähr für drei bis vier Monate, die Lagerung in Holzfässern kann bis zu zwölf Monaten dauern. Die Bildung von Histamin in der Lagerperiode läuft vor allem zwischen dem vierten und achten Monat ab. Bei allen anderen Aminen die in dieser Studie untersucht wurden konnte dieser Zusammenhang nicht gefunden werden. Weder ein biologischer Säureabbau, noch eine Reifung des Weines in Holzfässern, erhöht die Konzentration dieser Amine signifikant. Dieser Befund stimmt auch mit den Angaben diverser Literaturstellen überein.

Daeschel und Soufleros et al. [35] sind der Meinung, dass Weine mit Histaminkonzentrationen zwischen 8 – 20 mg/L toxische Effekte zeigen können, wenn sie in entsprechenden Mengen konsumiert werden.

Obwohl Tyramin neben Putrescin und Histamin das häufigste biogene Amin im Wein sein soll [24] konnte es insgesamt nur in sechs Weinproben bestimmt werden. In drei Proben wurden nennenswerte Mengen (2,3 – 7,8 mg/L) gefunden, wobei diese vom selben Weingut

stammen und unter Durchführung eines BSA hergestellt wurden. Die meisten der Milchsäurebakterien die für einen biologischen Säureabbau verwendet werden können, produzieren Tyramin in Labormedien. Für die Bildung von Tyramin im Wein ist hauptsächlich *Lactobacillus brevis* verantwortlich. Weiters konnte gezeigt werden, dass *L. mesenteroides* Stämme ein großes Potential für Tyraminbildung besitzen. In Käse konnte die Bildung von Tyramin und Histamin durch Kontamination mit *L. brevis* und *L. buchneri* nachgewiesen werden [22].

Die Gehalte an β -Phenylethylamin sind, wenn überhaupt bestimmbar, sehr niedrig (Nachweisgrenze 15 ng/mL). Der Höchstwert liegt bei 0,8 mg/L. Grundsätzlich sollen Rotweine signifikant höhere Gehalte als Weißweine besitzen [7].

Das Diamin Cadaverin findet sich relativ häufig in Lebensmitteln, jedoch nicht in alkoholischen Getränken. Die detektierten Gehalte befinden sich im Bereich von 0,1 – 0,7 mg/L. Ein Unterschied in den Konzentrationen für Rot- bzw. Weißweinen kann auch in publizierten Studien nicht festgestellt werden. Wie Putrescin wird auch Cadaverin als ein Indikator für schlechte Hygiene angesehen. Die Bildung von Cadaverin erfolgt durch mikrobielle Decarboxylierung von Lysin durch Enterobakterien. Die Kontamination mit diesen Bakterien ist in Weinen aber nicht üblich [7].

Die Polyamine Spermin und Spermidin haben keinen bakteriellen Ursprung. Bereits durchgeführte Studien zeigen was auch in dieser Untersuchung bestätigt werden konnte. Spermin ist in keiner Weinprobe detektierbar, Spermidin hingegen schon. Fakt ist, dass pflanzliche Produkte grundsätzlich mehr Spermidin als Spermin enthalten, während Tiere mehr Spermin als Spermidin besitzen. Die im Wein enthaltenen Polyamine könnten von den Trauben kommen, aber auch bei der Lyse der Hefe frei werden. Vor allem verschiedene Kultur- und Umweltbedingungen spiegeln sich in unterschiedlichen Polyamingehalten wider. Der Verlauf und die Intensität des Di- und Polyaminmetabolismus sind eine Reaktion auf den Wasser- und Trockenstress, abhängig von der Spezies und des Pflanzenteiles [7].

Die Gesamtamingehalte der Weine liegen zwischen 12,2 und 64,9 mg/L. Da jedoch nicht alle der Amine in ihrer physiologischen Wirkung identisch sind, kann aus diesen Werten auf kein toxikologisches Potential geschlossen werden. Weine mit Histaminwerten über 10 mg/L können aber bei empfindlichen Personen Intoleranzreaktionen hervorrufen. Da Putrescin und Cadaverin vom selben Enzym abgebaut werden wie Histamin, können hohe Gehalte den Histaminabbau hemmen und daher ebenfalls zu Intoleranzerscheinungen beitragen. Diese Symptome können durch den gleichzeitigen Konsum anderer Nahrungsmittel mit hohen Gehalten an BA verstärkt werden.

Ein Unterschied in den Aminkonzentrationen zwischen steirischen und ausländischen Weißweinen besteht nicht. Bei rund der Hälfte der ausländischen Weißweinproben liegen die Histamingehalte über 10 mg/L. Das gewählte Herstellungsverfahren ist bei diesen Proben nicht bekannt, vermutlich wurde aber der Grossteil unter Anwendung eines BSA und Holzfasslagerung hergestellt, da diese Verfahren bei Qualitätsweißweinen immer häufiger Anwendung findet.

Der Vergleich der drei Ansätze eines Weingutes, jeweils mit und ohne BSA, zeigt deutlich, dass die Durchführung eines BSA zur Reduktion der Apfelsäure einen wesentlichen Beitrag zur Bildung einiger biogener Amine leistet. Weinproben mit durchgeführtem BSA haben teilweise mehr als 50 % höhere Gehalte an Histamin, Putrescin und Tyramin. In diesen sechs Proben besteht ein signifikanter Unterschied der Gehalte aller drei Amine im Vergleich mit/ohne BSA, wobei alle Proben in Holzfässern gelagert wurden. Daraus ist zu erkennen, dass eine längere Lagerperiode in Holzfässern nicht automatisch zu hohen Histaminwerten führt. Die Durchführung eines biologischen Säureabbaus ist ein wesentlicher Faktor der die Konzentration an bestimmten Aminen erhöht. Vorallem die Kombination von BSA und Holzfasslagerung fördert die vermehrte Bildung von Histamin. Ein Grund dafür könnte sein, dass durch die Durchführung eines BSA den entsprechenden Milchsäurebakterien bessere Milieubedingungen geboten werden (pH-Wert Erhöhung) und diese dann in der Lagerperiode dadurch metabolisch leichter aktiv werden können. Die HDC von *Leuc. oenos 9204* besitzt bei pH 4,8 ihre maximale Enzymaktivität. Bei tieferen pH-Werten sinkt auch die Enzymaktivität. [25]. Die im Vergleich zu anderen Weinproben doch recht hohen Werte von Putrescin können durch eine ungünstige Mikroflora im Weinkeller entstehen. Interessant ist, dass in den drei Weinproben, in denen kein BSA durchgeführt wurde auch kein Tyramin zu finden ist, hingegen befinden sich in den Proben mit BSA die höchsten gemessenen Tyraminkonzentrationen. Dies lässt darauf schließen, dass für die Durchführung des BSA Stämme verwendet wurden, die eine relativ hohe Tyrosin-Decarboxylaseaktivität besitzen.

F. Gardini et al. [21] zeigte in Labormedien, dass *O. oeni T56* vor allem bei höheren pH-Werten (ab 3,6) und niedrigeren Alkoholkonzentrationen (9 – 11 %) Tyramin bildet.

Wie bereits diskutiert, üben neben dem Ausgangsmaterial auch der Verarbeitungsprozess und die klimatischen Bedingungen einen Einfluss auf den BA Gehalt aus [21]. Das Weinbaujahr 2003 war vor allem durch Trockenheit und sehr hohe Temperaturen gekennzeichnet. Das kann eine Ursache dafür sein, dass in einigen Weinen die Gehalte an biogenen Aminen doch bedenkliche Werte erreichten. Unerwünschte Bakterien und Hefen gelangten vermehrt bei unzureichender Kühlung des Traubenguts in den Most. In der Folge kam es zu Fehlgärungen

durch wilde Hefestämme und der biologische Säureabbau wurde spontan, aufgrund vorhandener Milchsäurebakterien, ausgelöst. Milchsäurebakterien, die in Form von Kontaminanten in den Most gelangen, besitzen grossteils Decarboxylaseaktivität und induzieren den BSA meist vor Zugabe ausgewählter Kulturen. Eine verzögerte Hauptgärung und ein erhöhter pH-Wert des Mostes unterstützen dies. Nur der Zusatz von selektionierten Stämmen gewährleistet einen BSA Verlauf der nicht zur Anhäufung unerwünschter Amine führt. Der Grossteil der heimischen Weinbauern hat keine Möglichkeit ihr Lesegut ausreichend zu kühlen. Daher können sich bei hohen Erntetemperaturen erhebliche Probleme aus mikrobiologischer Sicht entwickeln.

BSA-Versuch

Der Verlauf der Bildung der Amine während Hauptgärung und BSA konnte durch die Vermessung von Proben aus gezielten Ansätzen unterschiedlicher Varianten des BSA verfolgt werden.

Im Ausgangsmost konnten die Amine Ethanolamin, β -Phenylethylamin, Putrescin und Spermidin bestimmt werden, Cadaverin, Histamin, Tyramin, Spermin und Tryptamin hingegen nicht. Eine Bildung von Cadaverin und Histamin konnte in den Wochen der Gärung detektiert werden, die restlichen drei Amine waren in keiner Probe zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Die Entstehung von Histamin verlief kontinuierlich über die Zeit. Da während der Hauptgärung keine fortlaufende Probennahme erfolgte, konnte der Bildungsbeginn nicht festgestellt werden. Es zeigt sich jedoch, dass bereits in der Hauptgärung Histamin entsteht und in den folgenden Tagen des biologischen Säureabbaus sich die Konzentrationen nur mehr geringfügig veränderten. Auf den ersten Blick erscheint der Ansatz BSA 3 mit dem Stamm β als günstig, weil hier die geringste Endkonzentration an Histamin entsteht. Im zweiten Ansatz, der gleichen Variante, ist aber am Ende des BSA die zweithöchste Konzentration vorhanden. Dies ist nicht direkt auf den verwendeten Stamm zurückzuführen, da ein ungünstigerer Verlauf auch andere Ursachen, wie z.B. zusätzliche Kontamination mit anderen Bakterien, haben kann. Jedoch erkennt man aus der Auswertung der Ergebnisse, dass während des BSA die gewählte Variante keine unmittelbare Auswirkung auf die Endkonzentration hat. Eine verstärkte Bildung von Histamin erfolgt hauptsächlich während der Lagerung durch latente Milchsäurebakterien. Werden für den BSA keine speziellen Kulturen zugesetzt, können vorhandene decarboxylaseaktive Stämme nicht überwachsen werden was in der Folge während der Reifezeit des Weines zur vermehrten Anreicherung von Histamin führt.

Ethanolamin hat bereits im Ausgangsmost eine Konzentration von 15 mg/L. Der Gehalt steigert sich während des Verlaufs, wobei die Zunahme nicht stetig erfolgt. Ethanolamin und β -Phenylethylamin sind bereits im Traubenmost vorhanden und können während der Vinifizierung produziert aber auch abgebaut werden [24]. Die Konzentration von β -Phenylethylamin nimmt in allen angesetzten Varianten ab.

Bei Putrescin fällt auf, dass während der Hauptgärung die bereits vorhandenen Mengen im Ausgangsmost konstant bleiben bzw. teilweise abnehmen. Erst während des BSA kommt es zu einem leichten Anstieg der Konzentrationen, wobei in keinem Gäransatz eine nennenswerte Menge entsteht. Normalerweise ist Putrescin das mengenmäßig häufigste Amin im Wein.

Cadaverin ist im Wein nur sehr selten und wenn dann in sehr niedrigen Konzentrationen zu finden. Detektierbare Konzentrationen entstanden vor allem während der Hauptgärung; während des folgenden BSA steigerten sich die Mengen nur geringfügig.

Überraschender ist der Verlauf von Spermidin, da die Konzentrationen während der Prozessierung zunehmen. Das Polyamin Spermidin ist ein bedeutender Pflanzenbestandteil und daher bereits im Ausgangsmost enthalten. Während *S. Bover-Cid et al.* [7] in seiner Publikation die Anwesenheit von Spermidin im Wein auf keinen bakteriellen Ursprung zurückführt, konnte *F. Gardini et al.* [21] die Bildung von Spermidin durch *O. oeni T56* in Labormedien charakterisieren. Zu einer verstärkten Produktion von Spermidin kommt es bei einem pH-Wert von 3,0 und einer Ethanolkonzentration von 12 %. Bei geringeren Ethanolkonzentrationen und höheren pH-Werten verringert sich die Bildung [21]. Ein Anstieg am Ende der Hauptgärung lässt sich durch die Autolyse der Hefe erklären, wodurch Spermidin frei wird.

Die Bildung der Amine erfolgt durch Decarboxylierung der entsprechenden Aminosäuren. Eine verstärkte Zunahme von Aminen muss daher gleichzeitig zu einer Abnahme der Aminosäurekonzentration führen. Für die Bewertung dieser Korrelation wurden die gemessenen Aminosäurekonzentrationen jeder Variante gegen die entsprechende Aminkonzentration aufgetragen.

Aus all den Diagrammen ist zu erkennen, dass die Konzentration der Aminosäuren am Ende der Gärung ihr Minimum erreicht und in der Folge wieder ansteigt. Während des Hefewachstums kommt es zum Verbrauch der Aminosäuren und durch die Lyse der Zellen am Ende der Gärung wieder zum Anstieg. Im darauf folgenden biologischen Säureabbau werden durch die Milchsäurebakterien nicht die selben Mengen an Aminosäuren verwertet wie durch die Hefen frei werden wodurch es zu einer Anreicherung kommt. Abb. 58

verdeutlicht dies und es ist auch erkennbar, dass Tyrosin eine Ausnahme ist. Der Gehalt an Tyrosin ist im Ausgangsmost am geringsten, nimmt während der Hauptgärung und des BSA zu. Das Decarboxylierungsprodukt von Tyrosin, Tyramin, konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden. Tyrosin ist für Menschen und Tiere eine essentielle Aminosäure da sie nicht selbst synthetisiert werden kann. Mikroorganismen und auch Pflanzen produzieren hingegen Tyrosin über mehrere Syntheseschritte [19]. Die Zunahme der Tyrosinkonzentration über den Gärverlauf kann durch die Syntheseleistung vorhandener Mikroorganismen begründet sein. Wenn Tyrosin aus dem Medium nicht verstoffwechselt wird und synthetisiertes bei der Zellyse frei wird, kommt es in Folge zur Anreicherung.

Aus den Diagrammen der Auftragung Aminosäure versus Amin lassen sich schwer Aussagen über erkennbare Korrelationen machen. Ein Grund dafür besteht wie erwähnt darin, dass durch die Hefelyse Aminosäuren frei werden und sich diese Zunahme teilweise über die gesamte Dauer des BSA streckt. Weiters unterscheiden sich die Konzentrationsbereiche von Aminen und Aminosäuren zu sehr um hier einen Zusammenhang erkennbar zu machen. Insgesamt lässt sich erkennen, dass die Aminosäure- und auch Aminkonzentrationen der Ansätze gleicher Varianten den gleichen Verlauf zeigen und sich grossteils nur geringfügig unterscheiden.

Gesundheitliche Aspekte

Aus den Ergebnissen dieser Studie ist erkennbar, dass die vorhandenen Konzentrationen von Histamin im Wein in einigen Fällen durchaus zu klinischen Intoleranzsymptomen führen können. In einigen Proben konnten auch höhere Konzentrationen an Putrescin bestimmt werden. Das gleichzeitige Vorhandensein von Putrescin und Histamin kann zu einer Verstärkung der Histaminintoleranzreaktionen führen, weil beide Amine durch die Diaminoxidase abgebaut werden. Dadurch kann Histamin nicht rasch genug metabolisiert werden, es kommt zur Anhäufung einer höheren Konzentration im Körper und dies kann bei empfindlichen Personen zu entsprechenden Symptomen führen.

Obwohl alkoholische Getränke im Vergleich zu Käse, Rohwürsten und belastetem Fisch recht geringe Histaminmengen aufweisen, werden sie am häufigsten als Auslöser von Beschwerden genannt. Die Gründe dafür können vielfältig sein. Erstens erfolgt die Histaminaufnahme aus Flüssigkeiten sehr viel rascher und „geballter“ als aus fester Nahrung, wodurch es zu einer kurzen, aber intensiven örtlichen Belastung der Histaminabbaumechanismen in der Darmschleimhaut kommt. Zusätzlich erhöht der Alkohol die Durchlässigkeit der Darmwand,

so dass Histamin, aber auch andere biogene Amine, aus alkoholischen Getränken selbst oder aus der gleichzeitig aufgenommenen Nahrung, verstärkt unmetabolisiert in den Blutkreislauf gelangen kann. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass insbesondere der gleichzeitige Konsum von Alkohol und histaminreichen Nahrungsmitteln (z.B. Käse + Rotwein) besonders häufig zu Beschwerden führt. Alkohol und das Abbauprodukt Acetaldehyd hemmen die DAO, was ebenfalls ein vermehrtes Einströmen von Histamin in den Körper zur Folge hat. Weiters steht Alkohol unter Verdacht, als unspezifischer „Histaminliberator“ direkt präformiertes Histamin aus basophilen Granulozyten und/oder Mastzellen freisetzen zu können, wobei individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber diesem Stimulus entscheidend für die Verträglichkeit/Unverträglichkeit von Alkohol sind. Aber auch Alkohol selbst wirkt gefäßerweiternd und kann so Symptome wie Gesichtsrötung, Hitzegefühl oder Kopfschmerz verursachen. In durchgeführten Rotwein-Provokationstests wurde den Probanden Rotwein mit einer bestimmten Menge Histamin zugeführt und die Histaminspiegel nach 15 und 30 Minuten gemessen. Eine Normalperson zeigt einen niedrigen Ausgangswert von Histamin, einen leichten Anstieg nach 15 Minuten und ein Zurückkehren auf den Ausgangswert nach 30 Minuten. Probanden, die Histaminintolerant sind, zeigen einen gegenüber Normalen bereits erhöhten Ausgangswert und ein kontinuierliches Ansteigen des Histaminspiegels im Blut bei Histaminbelastung durch Weintrinken. Ein durchgeführter Wein-Maximationstest zeigte, wie gesunde Probanden bei großer Menge zugeführten Histamins mit ihrem Histamin- und DAO-Parameter reagieren. Trotz steigender und großer Histaminzufuhr blieb der Histaminspiegel gleich, da er offenbar stets von der DAO entsprechend abgebaut wurde. [1]

Zur Diagnose von Histaminintoleranz ist naturgemäß die Kenntnis von Nahrungsmitteln die Histamin, aber auch andere biogene Amine enthalten, notwendig.

Für histaminintolerante Personen, 80 % der betroffenen sind Frauen, wäre eine gesetzliche Regelung der erlaubten Konzentrationen in unterschiedlichen Lebensmitteln hilfreich. Eine einheitliche EU weite Regelung gibt es derzeit nur für Fisch. Für Histaminwerte im Wein gibt es je nach Land unterschiedliche Empfehlungen, wobei für Österreich die empfohlene Höchstgrenze bei 10 mg/L liegt [26]. Natürlich spielt neben dem absoluten Gehalt an biogenen Aminen eines Lebensmittels auch die konsumierte Menge eine wesentliche Rolle.

Um den Bildungverlauf der Amine noch genauer charakterisieren zu können, wäre es einerseits wichtig die Veränderungen der Konzentrationen im Laufe der Lagerung zu bestimmen und andererseits müssten auch Faktoren wie Weinsorte, Klima, Lage bzw.

Bodenbeschaffenheit und verwendetes Herstellungsverfahren stärker mit einbezogen werden. Unter Berücksichtigung aller dieser Daten könnten dann gezielt wirksame Maßnahmen zur Reduktion der Aminkonzentrationen getroffen werden.

Folgendes Zitat von Plutarch von Chäronea ist angesichts dieser Studie wohl nicht allgemein gültig:

„Wein ist unter den Getränken das nützlichste
und unter den Arzneien die angenehmste“

Plutarch von Chäronea (etwa 50 - 120 n.Chr.)
Griechischer Philosoph, Historiker und Konsul von Griechenland

8. Literaturverzeichnis

- [1] Jarisch R., *Histamin-Intoleranz*, 1999, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag
- [2] Halász A., Barát Á., Holzapfel W.H., *The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration*, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A, 1999, 208, 418-423.
- [4] Bardócz S., *Polyamines in food and their consequences for food quality and human health*, Trends in Food Science & Technology, 1995, 6, 341-346.
- [3] Seiler N., Demisch L., Schneider H., *Biochemie und Funktion von biogenen Aminen im Zentralnervensystem*, Angewandte Chemie, 1971, 83, 53-88.
- [5] Loukou Z., Zotou A., *Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 2003, 996, 103-113.
- [6] Herbert P., Carbrita M.J., Ratola N., Laureano O., Alves A., *Free amino acid and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage*, Journal of Food Engineering, 2005, 66, 315-322.
- [7] Bover-Cid S., Iquierdo-Pulido M., Mariné-Font A., Vidal-Carou M., *Biogenic mono, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation*, Food Chemistry, 2005.
- [8] Anonymus, *Weinfehler: Biogene Amine*, Schweizer Zeitschrift für Obst-Weinbau, Nr. 15/96, 410.
- [9] Falbe J., Regitz M., *CD Römpp Chemie Lexikon*, 9. korrigierte Auflage, Version 1.0, 1995, Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag.
- [10] Menghin S., *Analoge des Histaprodifens als potente und selektive Agonisten des Histamin-H₁-Rezeptors-Synthese, pharmakologische Charakterisierung und Struktur-Wirkungsbeziehungen*, www.diss.fu-berlin.de/2004/103, gelesen am 22.05.2005.
- [11] Pecelj J., *Biogene Amine; Ihre Rolle in Gesundheit und Krankheit und orthomolekulare Behandlungsmöglichkeiten*, www.orthomedis.ch, gelesen am 09.05.2005.

- [12] Schmidt R.F., Thews G., *Physiologie des Menschen*, 25. Auflage, 1993, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- [13] Meziani K., Benamouzig R., Mahé S., Martin A., Tomé D., *Decontamination of digestive tract alters polyamine metabolism and increases colonic cell proliferation*, Food Science and Technology COST 917 Biogenically active amines in food, 2002, VI, 27-33.
- [14] Polyamines in Food, *Consequences for Food Quality and Human Health (1992-1996)*, European Union AIR Concerted Action 569/92, Meeting
- [15] Bardóz S., Duguid T.J., Brown D.S., Pusztai A., Grant G., Ewen S.W.B., Perin A., Sessa A., Koninkx J.F.G.J., Hendriks H.G.J.M., Kok W., Tomé D.A., Benamouzig R., Brachet P., *Bioavailability*, European Union AIR Concerted Action 569/92, 19 - 22.
- [16] Wallace H.M., Hughes A., Thompson K., *The potential chemotherapeutic and chemopreventive benefits of modulating polyamine biosynthesis*, Food science and technology COST Action 917 Biogenically active amines in food, 2002, V, 29-36.
- [17] Halász A., Baráth Á., *Toxicity of biogenic amines- the present knowledge*, Food science and technology COST 917 Biogenically active amines in food, 2002, VI, 131-141.
- [18] Straub B.W., Kicherer M., Schilcher S.M., Hammes W.P., *The formation of biogenic amines by fermentation organisms*, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung, 1995, 201, 79-82.
- [19] Voet D., Voet J.G., Pratt C.W., *Biochemie*, 2002, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [20] Halász A., Barát Á., Simon-Sarkadi L., Holzapfel W.H., *Biogenic amines and their production by microorganisms in food*, Trends in Food Science & Technology, 1994, 5.
- [21] Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M., Mastrocola D., Suzzi G., *Factors influencing biogenic amine production by a strain of Oenococcus oeni in a model system*, Food Control, 2005, 16, 609-616.
- [22] Moreno-Arribas V.M., Polo C.M., Jorganes F., Muñoz R., *Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine*, International Journal of Food Microbiology, 2003, 84, 117-123.

- [23] Maicas S., Pardo I., Freere S., *The potential of positively-charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using Oenococcus oeni*, Enzyme and microbial Technology, 2001, 28, 415-419.
- [24] Lonvaud-Funel A., *Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria*, FEMS Microbiology Letters, 2001, 199, 9-13.
- [25] Rollan G.C., Coton E., Lonvaud-Funel A., *Histidin decarboxylase activity of Leuconostoc oenos 9204*, Food Microbiology, 1995, 12, 455-461.
- [26] Lehtonen P., *Biogenic amines in wine*, Food Science and Technology COST 917 Biogenically active amines in food, 2002, VI, 165-170.
- [27] Flitsch W., *Wein*, 1994, Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag
- [28] Heiss R., *Lebensmitteltechnologie*, 1996, 5. Auflage, Berlin, Springer
- [29] Kromidas S., *Validierung in der Analytik*, 2003, 2. korrigierter Nachdruck, Weinheim, Wiley-VCH.
- [30] Methoden der Kalibration von Analysenverfahren,
www.iac.tuwien.ac.at/instprakt/gcfid.pdf, gelesen am 4.12.2004
- [31] Hansen C., *Viniflora CH35*, CHR HANSEN, Produktfolder
- [32] Krieger S., *Starterkulturen für den biologischen Säureabbau*, Danster Ferment AG, Lallemand, 2004, Stuttgart.
- [33] Zischka M., Auswertung von Messdaten, Skriptum zur Vorlesung 545.062, 2000.
- [34] Romero R., Gázquez D., Bagur M.G., Sánchez-Viñas M., *Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 2000, 871, 75-83.
- [35] Torrea D., Ancín C., *Content of biogenic amines in a Chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50, 4895-4899.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

BA	biogene Amine
GMP	Good Manufacturing Practice
DAO	Diaminoxidase
ADH	Alkoholdehydrogenase
SAM	S-Adenosy-L-Methionin
IgE	Immunoglobulin E
ZNS	Zentralnervensystem
MAO	Monoaminoxidase
MG	Molekulargewicht
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
ODC	Ornithin Decarboxylase
DFMO	α -Difluoromethylornithin
PLP	Pyridoxal-5-Phosphat
MLF	Malolaktische Fermentation
BSA	Biologischer Säureabbau
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
RP	Reversed Phase
FLD	Fluoreszenzdetektor
IS	interner Standard
HDC	Histidin Decarboxylase
Abb.	Abbildung
LU	Luminiszenzeinheiten
V _k	Variationskoeffizient

9.2 Geräteliste

HP 1100 Agilent series, Waldbronn, Germany

pH-Meter, Model 720A, Orion

Heizblock

9.3 Chemikalienliste

Putrescin Dihydrochlorid, 98%, Sigma (St.Louis, MO, USA), 1g

Spermin, 95%, Sigma (St.Louis, MO, USA), 1g

β -Phenylethylamin Hydrochlorid, Sigma (St.Louis, MO, USA), 5g

Tryptamin Hydrochlorid, 98%, Sigma (St.Louis, MO, USA), 1g

Tyramin, Sigma (St.Louis, MO, USA), 1g

Spermidin Dihydrochlorid, Sigma (St.Louis, MO, USA), 1g

Histamin Dihydrochlorid, min.99%, Sigma (St.Louis, MO, USA), 5g

Cadaverin Dihydrochlorid, >98%, Sigma (St.Louis, MO, USA), 1g

1,7 Diaminoheptan, Sigma (St.Louis, MO, USA), 2g

Dansylchlorid, >99%, Fluka, 1g

Dansylchlorid, 95%, Sigma (St.Louis, MO, USA), 1g

Ethanolamin Hydrochlorid, Sigma (St.Louis, MO, USA), 100g

Ethanol, HPLC grade, Merk (Darmstadt), 1L

3,3' thiodipropionsäure, 97%, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA), 5g

Aceton, HPLC grade, LGC Promochem (Wesel Germany), 2,5L

Acetonitril, HPLC grade, LGC Promochem (Wesel Germany), 4L

N,N-Dimethylformamid, 99,9+%, Merk (Darmstadt), 1L

Essigsäure, 100%, Riedel-de Häen (Seelze, Germany), 2,5L

Methyl-tert-butylether, HPC grade, Promochem (Wesel, Germany), 2,5L

Triethylamin, Merk (Darmstadt), 1L

Waters AccQ·Tag Chemistry Package inklusive AccQ·reagent Kit, Aminosäurehydrolysat Standard und Sample tubes (6x50mm), Waters (Milford, MA, USA)

L-glutamin, >99%, Sigma (St.Louis, MO, USA)