

ŞARAPLARDA BAZI BİYOJEN AMİNLERİN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF SOME BIOGENIC AMINS IN WINES

R. Ertan ANLI

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü / Ankara

ÖZET: Biyojen aminler fermente gıda ürünlerinde sıklıkla rastlanan ve insan sağlığı bakımından özel bir öneme sahip olan bileşenlerdir. Şaraptaki biyojen amin oluşumunu ve miktarını serbest amino asit düzeyi, üzümdeki mikroorganizma yükü, pH, SO₂, sıcaklık, katılan maya besin maddeleri, maserasyon yöntemi, mikrobiyel etkiler gibi nedenler belirler. Bu çalışmada biyojenik aminlerden şaraplarda önemli miktarda bulunan histamin, tiramin, diaminobütan gibi bazıları HPLC yardımıyla 6 Türk şarabı örneğinde belirlenmiştir.

ABSTRACT: The presence of biogenic amines in wines is interest on the effect of human health. A large factors have been observed to affect their formation including; precursors amino acids, initial microbial population in grape, must treatment, contact time of must and grape skins, alcohol content, sulfur dioxide added nutrients, pH, temperature etc. In this research, 6 different Turkish wine samples from the 1998 harvest period have been analysed by using HPLC methods for determining their content of biogenic amines.

Giriş

Biyojen aminler, biyolojik aktiviteye sahip organik bileşenlerdir. Temel olarak amino asitlerin parçalanma ürünü olan bu bileşenler kimyasal olarak alifatik yapı gösterirler. Doğal olarak birçok fermente gıda ve gıda ürününde bulunabildikleri gibi, fermentasyon ya da daha sonra oluşabilen mikrobiyel faaliyetler sonucu da ortaya çıkabilmektedir. Şaraplarda bulunan temel biyojen aminler histamin, diaminobütan (putresin), tiramin, etilamin ve feniletilamin gibi bileşenlerdir (LETHONEN, 1996). Bu aminlerden etilaminin alkol fermentasyonu, diğerlerinin ise malolaktik fermentasyon sırasında oluştuğu yönünde bilgiler mevcuttur (LONVAUD-FUNEL, 1998). Biyojen aminler bira, sosisler, peynir vb. fermentasyon ürünlerinde de sorunlara neden olabilen bileşenler olmaları nedeni ile özel bir öneme sahiptirler. Biyojen aminlerden gerek toksikolojik, gerekse biyosentezi yönünden şaraplarda en fazla çalışılanı histamin'dir. Histamin ve diğer aminlerin şaraplardaki ve fermente ürünlerdeki varlığının insan sağlığı bakımından sakıncaları birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (BUSTO ve ark, 1996; BAUZA ve BLAISE, 1995). Aminlerin toksik etkileri üzerinde yapılan birçok çalışma bu bileşenlerin toksik etki sınırını belirtmekte güçlük çekmektedir. Özellikle baş ağrısı, kusma, ishal, stres, yorgunluk vb. etkenlere neden olmaktadır (HALASZ ve ark, 1994, JARRISH ve ark., 1996, LETHONEN, 1996). Aminlerin alkol ile birlikte ve/veya bazı ilaçlarla alındığında sağlık üzerindeki olumsuz etkisi daha da artmaktadır. Birçok araştırmacı şaraplardaki histamin miktarının maksimum düzeyi olarak 10 mg/L'yi vermektedirler. Ancak, bazı araştırmacılar ise 8 mg/L düzeyindeki histaminin baş ağrısını tetiklediğini ortaya koymaktadır (DESCHAEL ve ark., 1996). Yapılan araştırmaların birçoğunda, piyasadadan toplanan şarap örneklerinin histamin düzeyinin bu miktarın genellikle altında olduğu görülmektedir (OUGH, 1971). Buna karşın, biyojen aminlerin birçok fermente ürün için ne denli önemli bir sorun oluşturduğu görülmektedir. Biyojen aminlerle ilgili 1970'li yıllardan beri başlayan çalışmalar da günümüzde artarak sürmektedir. Uzun yıllar şaraplarda histamin oluşumundan sorumlu temel mikroorganizma olarak *Pediococcus* suşları üzerinde duruldu. Ancak, özellikle şarap teknolojisindeki ve mikrobiyolojisindeki gelişmelere paralel olarak, şarap üretiminde aktif olarak *Leuconostoc. oenos* (*Oenococcus oeni*) suşlarının da kullanılması araştırmacıları bu mikroorganizmanın da biyojen amin oluşumundaki etkisini araştırmaya yöneltmiştir.

BİYOJEN AMİNLERİN OLUŞUMU

Bilindiği gibi histamin histidin amino asitinin dekarboksilasyonu sonucunda oluşmaktadır. Histidin dekarboksilaz enzimi bakterilerde ve hayvansal hücrelerde bulunmaktadır. Şaraplarda malolaktik

fermentasyonda önemli bir role sahip olan *Leuconostoc oenos* suşları üzerinde yapılan çalışmalar, bu bakterinin tüm suşlarının histidinden histamin oluşturma yeteneğine sahip olmadığını göstermiştir. Diğer yandan, ortam koşullarının da biyojen amin oluşumu üzerinde öneme sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin Fransa'da yapılan bir çalışmada (LANVAUD-FUNEL, 1998) şaraplardan izole edilen *L. oenos IOEB 9204* suşu üzerinde durulmuş ve bu mikroorganizmanın %0-10 alkol konsantrasyonunda, daha yüksek alkol oranına göre daha fazla histidin dekarboksilaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, çalışmalar alkolün enzim üzerinde doğrudan bir etkisinin olmadığını da göstermektedir. Bu durumda, muhtemelen ortamdaki substratın hücreye taşınmasındaki aktivasyonun hafif akıcı ortamlarda daha fazla olduğu şeklinde açıklamalar yapılmaktadır. Nitekim alkol miktarının artışıyla sitrik asitin %78, laktik asitin ise %22 oranında bir inhibe olduğu belirlenmiştir. Hücrelerde histidin dekarboksilaz enziminin zamana bağlı stabilizasyonu çok sabittir. Şarap içindeki canlı hücre sayısı ise giderek azalmakta ve 2 aylık bir süre sonunda hiçbir canlı hücre saptanmamaktadır. Diğer yandan, histidin dekarboksilaz aktivitesi ise başlangıçta, yani depolama sürecinin ilk 15 gününde hızlı bir düşüş göstermekte (%39) daha sonra aktivite azalsa da, belli düzeyde kalmaktadır. Örneğin 4 ay sonra başlangıca göre aktivitenin %37 oranında olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak *L. oenos*'ta enzim aktivitesinin canlı popülasyon düzeyine göre daha sabit olduğu belirlenmiştir (LANVAUD-FUNEL, 1994).

Şu halde, bir fermente gıdada oluşabilecek biyojen aminlerin oluşumu üzerinde birçok faktör etkilidir. Şarap oluşumu sırasında ortamdaki malik asit varlığı histamin oluşumu üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmazken, şarabın malolaktik fermentasyon için tortu üzerinde kalması ve mikroorganizmaların otolizi sonucunda ortamın aminoasitler ve peptidler bakımından zenginleşmesi biyojen amin oluşumu üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir.

MATERYAL ve YÖNTEM

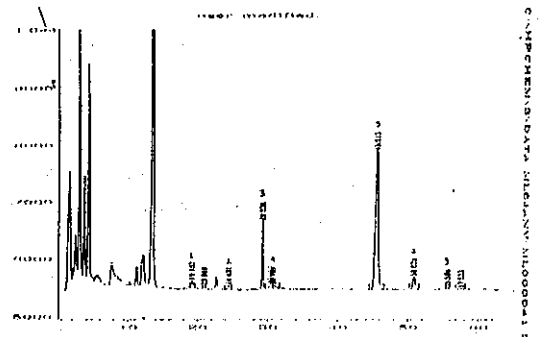
Materyal

Materyal olarak özel sektör tarafından 1998 yılında üretimi yapılan Cabernet Sauvignon, Merlot, Öküzgözü, Boğazkere, Carignan ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliğinde yine aynı yıl üretimi yapılan Kalecik karası tek çeşit (monosepaj) şarapları kullanılmıştır. Şarapların tümünde malolaktik fermentasyon doğal kültürle, sıcaklık kontrol edilerek yaptırılmış olup, herhangi bir laktik asit bakterisi suşu kullanılmamıştır. A solusyonu: 3.6 g disodyum hidrojenfosfat 1 litre di-sodyum hidrojenfosfat içinde çözüldürülmüş ve degaze işleminden sonra 45: m çapındaki filtreden süzümüştür. B solusyonu: 2/3 oranında asetonitri/oktan-2-ol pestipur (99/1; v/v) karışımı kullanılmıştır. İç standart olarak su-alkol solusyonunda hazırlanmış bütilamin kullanılmıştır. Enjek-siyon mikropipet yardımı ile 1: 1 düzeyinde yapılmıştır. Standartlar 0.5 g/L düzeyinde tutulmuştur. Akış hızı 0.8 ml/dak. Olarak seçilmiştir. 350 nm ekstikasyon ve 445 nm emisyon dalga boylarında ölçüm yapılmıştır.

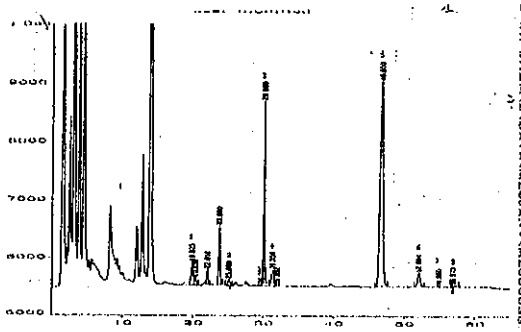
SONUÇ ve TARTIŞMA

Çizelge 1'de farklı Türk şaraplarına ait kromatogramlar verilmiştir.

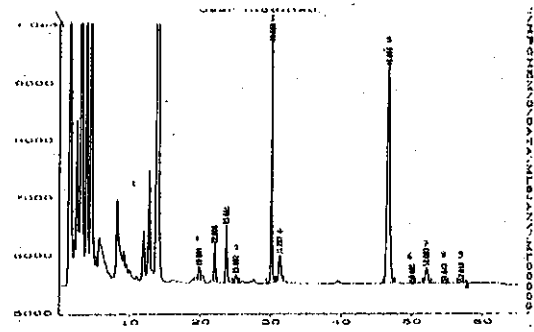
Çizelge 1. 1998 yılı üretimi Kalecik Karası (A), Öküzgözü (B), Boğazkere (C), Carignan (D), Cabernet Sauvignon (E) ve Merlot (F) Şaraplarına Ait Kromatogramlar



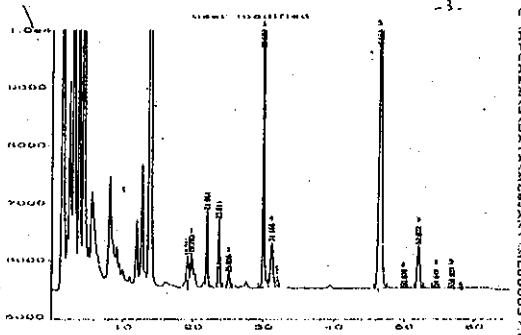
A- Kalecik Karası: 1- Histamin, 2-Metilamin, 3-Etilamin, 4- Triamin 5- İç standart 6- Feniletilamin 7-Diaminobütan 8- İzoamilamin 9-Diamino pentan



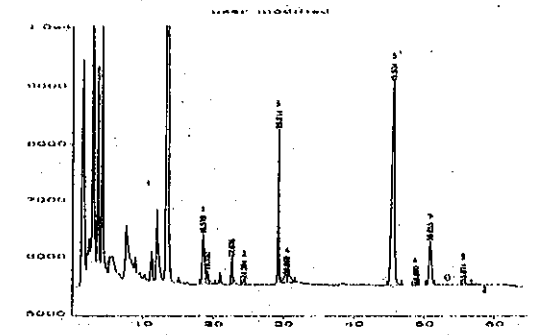
B- Öküzgözü: 1- Histamin 2- Metilamin, 3- Etilamin, 4- Tiramin 5- İç standart 6- Feniletilamin 7- Diaminobütan 8- İzoamilamin 9- Diamino pentan



C- Boğazkere: 1- Histamin, 2- Metilamin, 3- Etilamin, 4- Tiramin 5- İç standart 6- Feniletilamin 7- Diaminobütan 8- İzoamilamin 9- Diamino pentan



D- Carignan: 1- Histamin, 2- Metilamin, 3- Etilamin, 4- Tiramin 5- İç standart 6- Feniletilamin 7- Diaminobütan 8- İzoamilamin 9- Diamino pentan

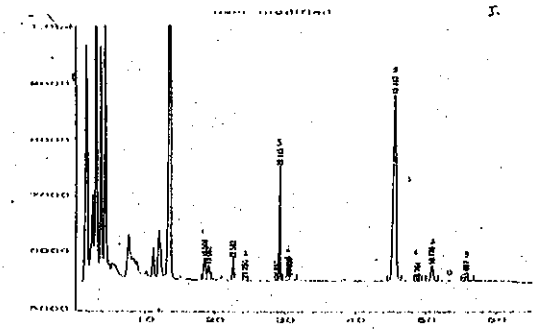


E- Cabernet sauvignon: 1- Histamin, 2- Metilamin, 3- Etilamin, 4- Tiramin 5- İç standart 6- Feniletilamin 7- Diaminobütan 8- İzoamilamin 9- Diamino pentan

Çizelge 2'de ise 1998 ürünü Türk şaraplarında belirlenen biyojen amin düzeyleri gösterilmektedir.

Çizelge 2. Farklı Türk Şaraplarında Belirlenen Biyojen Aminler

Biy. amin (mg/l)	Kalecik	Öküz-	Boğaz-	C. savuğ	Merlot	Carignan
Histamin	0.90	0.38	0.63	2.00	0.91	0.32
Metilamin	0.08	0.09	0.13	0.05	0.02	0.05
Etilamin	1.54	1.92	2.64	1.33	1.11	0.83
Tiramin	1.01	1.28	2.04	0.42	0.17	0.22
Feniletilamin	—	0.06	0.06	0.05	0.04	—
Diaminobütan	3.23	3.9	7.38	9.15	3.91	3.77
İzoamilamin	—	0.04	0.04	—	—	—
Diaminopentan	0.43	0.40	0.68	0.78	0.47	0.22



F- Merlot: 1- Histamin, 2- Metilamin, 3- Etilamin, 4- Tiramin 5- İç standart 6- Feniletilamin 7- Diaminobütan 8- İzoamilamin 9- Diamino pentan

Çizelge 2 incelendiğinde Türk şaraplarında saptanan biyojen amin miktarlarının genellikle düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Ancak diaminobütan düzeyinin hemen tüm şaraplarda belli bir düzeyde olduğu görülmektedir. Şüphesiz bu aminlerin oluşum nedenlerini saptamak için gerek alkol fermentasyonu koşullarının, gerekse malolaktik fermentasyon koşullarının kontrol altına alındığı şartlarda da ölçümlerin yapılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın gerçekleşmesinde şarap örneklerini sağlamada yardımcı olan Sevilen Şarapları'na ve laboratuvar olanaklarından yararlandığım Prof. Dr. A. Bertrand'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

- BAUZA, T., BLAÏSE, A. 1995. Les amines biogenes du vin, métabolisme et toxicité. Bull. OIV, 767-768: 42-67.
- BUSTO, O., GUASCH, J., BORULL, F. 1996. Biogenic amines in wine: a review of analytical methods. J. Int. Vigne Vin 30: 85-101.
- BUTEAU, C., DITSCHAUVER, C.L., ASHTON, G.C. 1984. High-performance liquid chromatographic detection and quantitation of amines in must and wine. J. Chromatogr. 284: 201-210.
- DESCHAEEL, M.A. 1996. Hedache in wine. In: Proceeding of the Symposium on Wine and Helth. A.L. Waterhouse and J.M. Rantz (Eds.) pp 29-34. American Society for Enology and Viticulture, Reno, Nevada
- HALASZ, A., BARATH, A. 1994 Biogenic amines and their microorganisms by microorganisms in food. Trends Food Sci. Technol. 5: 42-49.
- JARISCH, R., WANTKE, F., Wine and headache. Int. Art. Allergy Immunol. 110: 7-12.
- LANVAUD-FUNEL, A., ve JOYEUX, A. 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine producing strain of *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Bacteriol. 77 (4): 401-407.
- LANVAUD-FUNEL, A., COTON, E., TORLOIS, S., BERTRAND, A. 1998. Les amines biogenes et bacteries lactiques du vin. XIII. Congres Mondial de la Vigne et du Vin. II-29-34 p.
- LETHONEN, P. 1996. Determination of biogenic amines in wine-a review. Am. J. Enol. Vitic. 47: 127-123.
- OUGH, C.S. 1971. Measurement of histamine in California wines. Agric. Food Chem. 19 (2): 241-244.
- PEREIRA MONTERA, M.J., BERTRAND, A. 1994. Validation d'une methode de dosage. Application a l'analyse des amines biogenes du vin. Bull. OIV. 765: 917-962.
- VIDAL-CAROU, M.C., IZQUIERDO-PULIDO, M.L., MARINE-FONT., A. 19902. Spectrofluorometric detection of histamin in Spanish wines: their formation during the wine making process. Am. J. Enol. Vitic. 41: 160-167.