

ŞARAP VE BİRADA BİYOJEN AMİNLERİN ÖNEMİ VE OLUŞUMU

THE SIGNIFICANCE AND FORMATION OF BIOGEN AMINES IN WINE AND BEER

Yüksel DENLİ, R.Ertan ANLI

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

ÖZET: Bu derlemede şarap ve biralarda az veya çok bulunan ve potansiyel zehirliliklerinden dolayı oldukça önemli olan biyojen aminlerin oluşumu ve bu içkilerdeki miktarları ile ilgili yapılan çalışmalar irdelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyojen aminler, şarap, bira

ABSTRACT: Biogenic amines in wine and beer are important because of potential toxicity. In this paper different studies about occurrence, importance and amount of biogenic amines in wine and beer, have been compiled.

Key words: Biogenic amines, wine, beer.

GİRİŞ

Şarap ve birada biyojen amin önemi

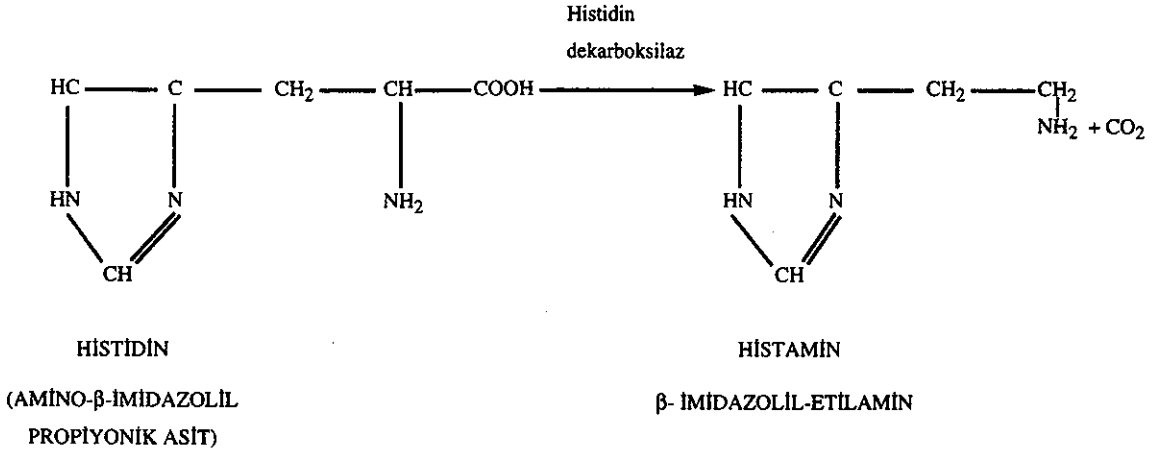
Biyojen aminler hemen hemen tüm gıda ürünlerinde bulunan, bitki hayvan ve mikroorganizmaların metabolizmaları sonucu oluşan küçük moleküllü bazlardır. Çoğunlukla fermente olmuş, ancak aynı zamanda bakterilerle bozulmuş protein bakımından zengin gıdalarda bulunmaktadır (LUTHY ve SCHLATTER 1983). Bira ve şarap gibi fermente alkollü içkiler; peynir, balık ve et gibi yüksek protein içeren gıdalarda biyojen aminler daha da önem kazanmaktadır. Özellikle balık ve diğer deniz ürünlerinde histamin ve tiramin gibi biyojen aminler bozulma indikatörü olarak kullanılmaktadır.

Biyojen aminlerin gıda açısından asıl önemi, bu ürünlerin potansiyel zehirliliklerinden ileri gelmektedir. Örneğin tiramin ve β -feniletilamin gibi biyojen aminler bazı hastalarda görülen yüksek tansiyon krizi ve migren gibi hastalıkların nedeni olarak gösterilirken, histamin ve diğer aminler de gıda zehirlenmesine neden olmaktadır (STRATTON 1990). Yine yapılan araştırmalar biyojen aminlerin aminooksidazı inhibe edici ilaçlar, alkol ve gastrointestinal hastalıklar gibi potansiyel faktörlerin zehirlenme etkisini artırdığı, hatta ölüme kadar götürdüğü ileri sürülmektedir (STRATTON ve ark. 1990, MAIJALA ve EEROLA 1993). Bunun yanında biyojen aminlerin dolaylı yoldan etkileri de söz konusudur. Örneğin yüksek tiramin içeren gıdaların alımı nedeniyle tedavi gören hastalara verilen monoamin oksidaz inhibitörü ilaçlar da yüksek tansiyon krizine yol açabilmektedirler (IZQUIERDOPULIDO 1994)

Bu çalışmada fermente alkollü içkilerin en önemlileri olan bira ve şarapta bulunan biyojen aminler üzerinde durulmuştur.

Şarap ve birada biyojen amin oluşumu

Şaraplarda biyojen aminlerin varlığının nedeni henüz yeterince açık değildir. Bununla birlikte aminlerin biyogenesini etkileyen faktörlerle ilgili farklı görüşler bulunsa da şarabın önemli biyojen aminleri olan histamin ve tiraminin histidin ve tirozinden mikrobiyel dekarboksilasyon sonucu oluştuğu şeklindeki görüşler yaygındır (VIDAL-CAROU ve ark. 1990). Şekil 1'de histidin amino asitinden dekarboksilasyon yoluyla histamin oluşumu görülmektedir.



Şekil 1. Histidinden dekarboksilasyon yoluyla histamin oluşumu (YAVAŞ 1983).

Diğer yandan, şaraplarda biyojen amin oluşumundan *Klebsiella* ve *Proteus* gibi bazı kontaminant enterik bakterilerinde sorumlu olduğu ifade edilmiştir (BUTEAU ve ark. 1984). Bu durum başka araştırmacılarında dikkatini çekmiş, histamin fazlalığının şarap üretiminde hijyenik koşullarla ilgili olduğu vurgulanmış, hijyenik açıdan optimum koşulların sağlandığı şaraplarda biyojen amin düzeyinin çok düşük olduğu belirtilmiştir (VIDAL-CAROU ve ark. 1990).

Kırmızı şarapların biyojen amin içeriği genel olarak beyaz şaraplara göre daha yüksek bulunmaktadır. Buna neden olarak kırmızı şarapların birçoğunun geçirdiği malolaktik fermentasyon gösterilmektedir. Kaliforniya kırmızı şarapları üzerine gerçekleştirilen bir araştırmada kırmızı şaraplarda ortalama 5 mg/l, beyaz şaraplarda ise bunun yarısı kadar histamin olduğu saptanmıştır (OUGH ve ark. 1987).

VIDAL-CAROU ve ark. (1990) şaraplarda biyojen amin oluşumunu 3 temel nedene bağlamışlardır.

1. Az miktarda da olsa sırada biyojen amin bulunabilir.
2. Mayalar tarafından alkol fermentasyonu sırasında bu maddeler oluşmaktadır.
3. Malolaktik fermentasyon sırasında mayalar tarafından oluşturulmaktadır.

İspanyol şaraplarında histamin ve tiramin içeriklerinin incelendiği bir başka çalışmada da kırmızı, beyaz ve rose şarap örneklerinde ortalama olarak sırasıyla 4.07, 0.81 ve 0.86 mg/l histamin ve 3.03, 1.49 ve 1.66 mg/l tiramin taptanmıştır. Histamin ve tiramin düzeyi ile SO₂ içeriği, uçar asit miktarı ve malolaktik fermentasyon arasındaki ilişkiyi de inceleyen araştırmacılar beyaz ve pembe şaraplarda bu iki amin ve uçar asit miktarı arasında önemli pozitif bir korelasyon belirlemelerine karşın kırmızı şaraplarda amin içeriği ve SO₂ düzeyi arasında oldukça önemli negatif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Bütün şarap örneklerinde amin içeriği ve malolaktik fermentasyon derecesi arasında pozitif korelasyon tespit etmişlerdir (VIDAL-CAROU ve ark. 1990).

POGORZELSKI (1992) şıra ve şaraplarda biyojen amin oluşumunu araştırmış ve özellikle histamin oluşumunda mayşeye uygulanan işlemlerin ve fermentasyonda kullanılan maya suşunun etkili olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmada histamin oluşumu üzerine histidin dekarboksilaz enziminin etkisine de değinilmiş ve Bordeaux bölgesi mayalarının fermentasyon sırasında diğer bölge mayalarına göre daha yüksek aktivitede histidin dekarboksilaz oluşturdukları belirlenmiştir.

İNIQUEZ ve VAZQUEZ (1994) beyaz, kırmızı ve pembe şarap örneklerinde histamin, tiramin, putresin ve kadaverin miktarlarını HPLC yardımı ile araştırmışlar ve en fazla kırmızı şarap örneklerinde sırasıyla 4.67, 3.38, 7.80 ve 0.54 mg/l düzeyinde bu aminleri belirlerken beyaz şarap örneklerinde sadece metilamin ve 2-feniletilamin (0.80-0.79 mg/l) miktarlarını yüksek bulmuşlar, ancak bu düzeylerin sağlık açısından risk oluşturacak oranlarda olmadığını bildirmişlerdir.

LANVAUD ve JOYEUX (1994) şaraptan izole edilen *Leuconostoc oenos* bakterisinin sentetik ortamda ve şarapta histamin oluşturma koşullarını incelemişler ve bu mikroorganizmanın glukoz ve malik asit içermeyen sentetik ortamda fazla miktarda histamin oluşturduğunu; etil alkol konsantrasyonun ve pH'nın da histamin oluşumunda önemli faktörler olduğunu bildirmişlerdir. Laktik asit bakterilerinin şaraplarda biyojen amin oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada da *Lactobacillus casei*, *Lac. buchneri*, *Lac. brevis*, *Leuconostoc oenos*, *Pediococcus damnosus* bakterilerinin bazı suşlarını 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmış ve sonuçta *L. buchneri*'nin B189 ve B190 suşlarının diğer bakterilere oranla daha fazla (41.3 ve 49.7 mg/l) histamin oluşturduğu gözlenmiştir (FAETH ve RADLER 1994).

ROLLAN ve ark. (1995) şarap üretimi sırasında malolaktik fermentasyondan sorumlu olan *Leuconostoc oenos* bakterisinin histidinden histamin oluşumunu için gerekli olan histidin dekarboksilaz enziminin aktivitesi üzerine şarapta bulunan farklı bileşiklerin (alkol, laktik asit, sitrik asit, glukoz vb.) etkilerini incelemişlerdir. Buna göre pH 7.6 da reaksiyon kurvesi sigmoidal bir eğri gösterirken, %12 alkol konsantrasyonunun da hücre süspansiyonu içerisindeki enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca L-laktik asit ve sitrik asitin de enzim aktivitesini azaltıcı rol oynadığı belirlenmiştir.

FARIAS ve ark. (1995) şarap fermentasyonu sırasında organik asit üretiminin histamin oluşumunu etkilediğini bildirmişler ve *L. hilgardii* 5W tarafından üretilen histidin dekarboksilaz enzimi üzerine malik ve sitrik asitin inhibe edici etkisinin olduğunu saptamışlardır. Örneğin 30°C'de 12 saat inkübasyon sonucunda 2 g/l düzeyinde L-malik asitin mikroorganizmanın enzim aktivitesini %71 düzeyinde azalttığını, buna karşın L-malik asit konsantrasyonu 0.5 g/l'ye düşürüldüğünde enzim aktivitesinin ancak %47'sinin inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

BAUZA ve ark. (1995) Fransa'nın Cotes du Rhone bölgesine ait 220 ticari şarap örneğinde biyojen amin miktarını inceledikleri çalışmalarında kırmızı şarapların beyaz şarapları oranla daha fazla biyojen amin düzeyine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Araştırmaya alınan şaraplarda en fazla putresin varlığı belirlenmiş (12.7 mg/l); histamin içeriğinin tiramin, etilamin ve putresin ile feniletilamin konsantrasyonunun ise izoamilamin konsantrasyonu ile önemli bir korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Yine bu çalışmada şaraplarda biyojen amin oluşumunda; azotlu gübre uygulaması, maya, maserasyon, alkol fermentasyonu süresi, ve tahta fıçılarda dinlendirme gibi faktörlerin etkili olduğu vurgulanmıştır.

Biralarda biyojen aminlerin varlığının bira üretimi sırasında maya aktivitesi ve/veya mikrobiyel bulaşmayla ilişkili olduğunu gösteren araştırmalar yanında biyojen aminlerin oluşmasında; malt, ilave edilen tahıllar ve şerbetçi otunun da potansiyel birer kaynak olduğunu iddia eden araştırmalar da mevcuttur. (IZQUIERDO-PULIDO ve ark. 1994).

DONHAUSER ve ark. (1992) farklı bira fabrikalarından sağlanan 80'e yakın bira örneğinin büyük bir kısmında toplam biyojen amin konsantrasyonunun 20 mg/l 'altında olduğunu, ancak bazı bira örneklerinde 160 mg/l'ye kadar çıkabildiğini bildirmişler ve biyojen aminler içerisinde tiramin ve kadaverinin daha fazla miktarlarda olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada yüksek biyojen amin konsantrasyonuna neden olarak mayşenin mikrobiyel kontaminasyona maruz kalması neden olarak gösterilmiştir.

HPLC yardımı ile 16 bira örneğinde 8 biyojen aminin (histamin, tiramin, triptamin, 2, feniletilamin, putresin, kadaverin, spermin ve spermidin) incelendiği bir çalışmada 6 amin tayin edilebilecek düzeylerde bulunurken histamin ve spermin saptanamamıştır. Belirlenen biyojen amin miktarları 0.1-17.2 ppm arasında değişiklik gösterirken bütün örneklerde tiramin ve putresin en yüksek düzeylerde bulunmuştur. Alkol içermeyen biralalar ile alkollü bira örnekleri arasında biyojen amin miktarı yönünden önemli bir fark bulunmamıştır (BUIATTI ve ark. 1995).

Uygun malt seçimi ile birlikte mısır şurubu, mısır, bağday, arpa ve pirinç ilavesinin fermente olmuş mayşede daha düşük düzeylerde biyojen amin oluşumuna neden olduğu ve katkı miktarındaki artışın biralarda biyojen amin oluşumunu azalttığını bildirilmiştir. Arpada sadece tiramin, putresin ve poliaminlerin (agmatin, spermin ve spermidin) varlığı belirlenmiş olmasına karşın, malt üretimi sonunda serotinin dışında diğer biyojen aminlerin de oluştuğu tespit edilmiştir. Malt üretimi sırasında biyojen aminlerin oluşumunun sıcaklık, çimlenme süresi, ku-

rutma sıcaklığı, depolama zamanı ve CO₂ düzeyi gibi bir çok faktör tarafından etkilendiği bildirilmiştir. Mayşeleme ve fermentasyon sırasında ise genel olarak biyojen amin içeriği artış göstermektedir. Mayşeleme sırasında amin içeriğinin artmasına neden olarak termal amino asit dekarboksilasyonu gösterilmektedir. Bununla birlikte maltın enzim aktivitesi veya olası kontaminant mikroorganizmalarında amin oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. (IZQUIERDO-PULIDO ve ark. 1994).

Çizelge 1. Bazı şarap ve bira örneklerinde saptanan biyojen amin miktarları (STRATTON ve ark. 1990).

İçkiler	Biy. Amin	Miktar (mg/l)
Şarap Amerika (Kırmızı)	Histamin	0.2-15.5
	Kadaverin	4.0-47.0
	Putresin	0.6-5.5
	Tiramin	ND -0.2
Amerika (Beyaz)	Histamin	0.2-11.4
	Kadaverin	3.2-108.3
	Putresin	0.7-11.7
	Tiramin	ND -0.2
Avrupa (Kırmızı)	Histamin	ND -30
	Tiramin	0.07-25.4
Avrupa (Beyaz)	Histamin	ND -20
	Tiramin	0.01-6.5
Nijerya (Palmşarabı)	Tiramin	11.27
Küba	Tiramin	ND -3.75
Japonya (Sake)	Tiramin	0.21-0.51
Bira Amerika	Putresin	3.7-7.1
	Tiramin	1.0-16.3
Kanada	Histamin	4.8-5.4
	Putresin	3.0-5.4
	Tiramin	11.7-17.6
Avrupa	Histamin	2.6-20.0
	Kadaverin	ND -55.2
	Putresin	2.6-6.6
	Tiramin	0.8-12.3
Japonya	Tiramin	0.2-1.3
Nijerya	Tiramin	7.2-7.4
Küba	Tiramin	1.2-9.3
Alkolsüz	Tiramin	0.5-4.0

ND belirlenemedi

IZQUIERDO-PULIDO ve ark. (1994) bira üretimi sırasında hammadde, mayşe ve bira örneklerinde HPLC yardımı ile biyojen aminlerin (histamin, tiramin, β-fenilettilamin, serotinin tiptamin, putresin, kadaverin, agmatin, spermin ve spermidin) oluşumunu inceledikleri çalışmalarında biralarda mevcut bulunan biyojen aminleri orijinlerine göre 3 grup altında toplamışlardır. Buna göre, birinci grup aminler (putresin, spermin ve spermidin) genellikle hammaddeden gelenler, ikinci grup aminler hem hammaddeden gelen hem de mayşeleme sırasında oluşan aminler (histamin β-fenilettilamin, kadaverin ve agmatin) olarak değerlendirilmiştir. Üçüncü grup aminler (triptamin ve tiramin) ise hammaddede mevcut olmaları ve mayşeleme sırasında oluşmaları yanında fermentasyon sırasında da oluşabilmektedirler.

Bira fermentasyonu sırasında *Sacc. cerevisiae var. uvarum*'un histamin ve tiramin oluşumu üzerine etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada, bir alt fermentasyon mayası olan bu mayanın fermentasyon sırasında adı geçen aminleri oluşturmadığı ve fermentasyon sırasında maya hücrelerinin karıştırılmasının bu aminlerin oluşmasında etken olmadığı bildirilmiştir (IZQUIERDO-PULIDO ve ark. 1995).

GEIGER ve ark. (1996) incelemeye aldıkları 116 bira örneğinin sadece %16'sında toplam biyojen amin konsantrasyonunun 20 mg/l'den daha yüksek olduğunu, belirlenen en yüksek biyojen amin konsantrasyonunun ise 140 mg/l olduğunu bildirmişlerdir. Biyojen aminler içerisinde en fazla β-fenilettilamin, putresin, kadaverin ve tiramin'e rastlanırken, histamin bira örneklerinde ya hiç bulunmamış ya da 3 mg/l'den daha az miktarlarda tayin edilmiştir. Aynı araştırmacılar bira üretiminin farklı aşamalarının (malt üretimi, mayşeleme, alkol fermentasyonu ve depolama) biyojen amin konsantrasyonu üzerine önemli bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Bira üretimi sırasında laktik asit bakterilerin biyojen amin oluşumu üzerine etkisi de söz konusu olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada 10 farklı biyojen amin ve mikrobiyel kontaminasyonun (yabani maya ve laktik asit bakterileri) etkileşimi bira fermentasyonu sırasında birlikte irdelenmiştir. Yedi gün süren fermentasyon sırasında amin içeriğinde önemli bir değişme gözlenmezken sadece tiramin konsantrasyonu belirgin bir şekilde (8 mg/l'den 30 mg/l'ye) artış göstermiştir. Yaba-

ni maya sayısı ile tiramin içeriği arasında herhangi bir ilişki bulunamazken tiramin ve laktik asit bakterileri arasında önemli pozitif bir ilişki belirlenmiştir. Örneğin laktik asit bakterisi sayısı 4×10^3 - 1×10^4 hücre/ml arasında olduğunda tiramin miktarı düşük düzeylerde (5 mg/l'den daha az) kalmasına rağmen, laktik asit bakterilerinin sayısı 1×10^5 hücre/ml'den fazla olduğunda ise tiramin düzeyi 15-25 mg/l'ye kadar artış göstermiştir. Laktik asit bakterilerini sayısı 4×10^3 'den az olduğunda ise tiramin oluşumu gözlenmemiştir (IZQUIERDO-PULIDO ve ark. 1996).

Çizelge 1'de bazı bira ve şarap örneklerinde bulunan biyojen aminler ve miktarları verilmiştir.

Sonuç olarak fermente alkollü içkilerde ve özellikle bira ve şarapta biyojen amin varlığı, sağlık açısından önemli bir sorun oluşturabilmektedir. Ülkemizde bu konuda henüz yeterli bir bilinç mevcut değildir. Bu nedenle başta fermente alkollü içkiler olmak üzere tüm alkollü içkilerde biyojen amin kontrolünün yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- BUIATTI, S., BOSCHELLE, O., MOZZON, M., BATTISTUTTA, F. 1995. Determination of Biogenic Amines in Alcoholic and Non-alcoholic Beers by HPLC. *Food Chemistry*. 52(2) 199-202.
- BUTEAU, C. and DUTSCHAEVER, C.L. 1984. High Performance Liquid Chromatographic Detection and Quantitation of Amines in Must and Wine. *Journal of Chromatography*, 284, 201-210.
- BAUZA, T., BLAISE, A., MESTRES, J.P., TEISSEDE, P.L., DAUMAS, F., CABANIS, J.C. 1995. Biogenic Amines Contents and Their Variation Parameters in Cotes du Rhone, Walleé du Rhone and Provence Wines. 15(4) 367-380.
- DONHAUSER, S., WAGNER, D., GEIGER, E. 1992. Biogen Amine. Bedeutung, vorkommen und Bewertung. *Brauwelt*. 132 (27) 1272-1280.
- FAETH, K.P and RADLER, F. 1994. Untersuchung der Aminbildung bei Milchsäurebakterien. *Wein-Wissenschaft*. 49(1) 11-16.
- FARIAS, M.E., MANCA-de-NADRA, M.C., ROLLAN, G.C., STRASSER-SAAD, A.M. 1995. Histidine decarboxylase production by *Lactobacillus hilgardii*: effect of organic acids. *Current Microbiology*; 31(1) 15-18.
- GEIGER, E., WAGNER, D., BRIEM, F., ENGLERT, S. 1996. Biogen Amine bei der Malz und Berbereitung. *Brauwelt*, 136(6) 254-258.
- INIQUEZ-CRESPO, M and VAZQUEZ-LASA, B. 1994. Determination of biogenic amines and other amines in wine by an optimized HPLC method with polarity gradient elution. *Am. J. of Enol. and Viticulture*. 45 (49). 460-463.
- IZQUIERDO-PULIDO, M., MARINE-FONT, A., VIDAL-CAROU, M.C., 1994. Biogenic Amines Formation During Malting and Brewing. *Journal of Food Science*. Volume 59(5), 1104-1107.
- IZQUIERDO-PULIDO, M., FONT-FABREGAS, J., VIDAL-CAROU, C. 1995. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvaurum* on histamine and tyramine formation during beer fermentation. *Food Chemistry*. 54(1) 51-54.
- IZQUIERDO-PULIDO, M., FONT-FABREGAS, J., CARCELLER-ROSA, J.M., MARINE-FONT, A., VIDAL-CAROU, C. 1996. Biogenic Amine Changes Related to Lactic Acid Bacteria During Brewing. *Journal of Food Protection*. 59(2) 175-180.
- LONVAUD-FUNEL, A. and JOYEUX, A. 1994. Histamin Production by Wine Lactic Acid Bacteria: Isolation of a Histamine Producing Strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*. 77(4) 401-407.
- LUTHY, J. and SCHLATTER, C., 1983. Biogene amines in Lebensmitteln. Zur Wirkung von Histamin, Tyramin und Phenylethylamin auf den Menschen. *Lebens. Unters. Forch*. 177, 439-443.
- MAIJALA, R and EEROLA, S. 1993. Contaminant Lactic Acid Bacteria of Dry Sausages Produce Histamine and Tyramine. *Meat Science*. 35(3) 387-395.
- POGORZELSKI, E. 1992. Studies on the formation of Histamine in Must and Wines From Elderberry Furit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 60(2) 239-244.
- ROLLAN, G.C., COTTON, E., LONVAUD-FUNEL, A. 1995. Histidine Decarboxylase Activity of *Leuconostoc oenos* 9204. *Food Microbiology*, 12(6) 455-461.
- STRATTON, J.E., HUTKINS, R.W., TAYLORS, S.L. 1990. Biogenic Amines in Cheese and Other Fermented Foods: A review. *J. Food Protect*. 54(6) 460-470.
- VIDAL-CAROU, M.C., ESPUNYES, A.A., ULLA-ULLA, M.C., MARINE-FONT, A. 1990. Histamine and Tyramine in Spanish Wines: Their Formation during the Winemaking Process. *Am. J. Enol. Vitic*. Vol. 41 (2), 160-167.
- YAVAŞ, İ., 1983. Şaraplarda Histaminin Önemi. *Tekel Enstitüleri Yayınları*: EM/008 Serisi. No:293, 1-17.