



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: A 23 L 1/00
A 23 L 2/34
A 23 K 1/00
A 23 C 7/04

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11)

641 644

(21) Gesuchsnummer: 9295/78

(73) Inhaber:
Emil Underberg, Dietlikon

(22) Anmeldungsdatum: 04.09.1978

(72) Erfinder:
Prof. Dr. Dr. Andreas Lembke, Eutin-Sielbeck
(DE)

(24) Patent erteilt: 15.03.1984

(74) Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

(54) Verfahren zur Herstellung von Histamin-armen, bzw. Histamin-freien Nahrungsmitteln, Genussmitteln und Futtermitteln und so hergestellte Produkte.

(57) Ein Verfahren zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Genussmitteln und Futtermitteln, die arm an Histamin oder histaminfrei sind. Es wird hiezu die auf dem Ausgangsmaterial vorhandene Mikroorganismenflora abgetötet und anschliessend wird während irgendeiner Stufe der Herstellung des Nahrungsmittels, Genussmittels oder Futtermittels ein Mikroorganismus oder ein entsprechendes Enzym zugegeben, welches vorhandenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

Während nämlich der grösste Teil der in der natürlichen Mikroorganismenflora vorhandenen Mikroorganismen im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin unter Decarboxylierung abbaut, wobei sich Histamin bildet, sind dennoch in der natürlichen Mikroorganismenflora solche Stämme vorhanden, die Histidin ohne Bildung von Histamin, beispielsweise durch Transaminierung oder Desamierung, abbauen, wobei sich völlig harmlose Abbauprodukte wie Glutaminsäure und/oder Ketoglutarsäure bilden.

Unter den bei Sammelstellen hinterlegten Mikroorganismen befinden sich solche Stämme die Histidin ohne Bildung von Histamin abbauen. Bei der Durchführung des erfundungsgemässen Verfahrens werden gezielt derartige Einzell-Reinkulturen, oder daraus gewonnene Enzyme,

eingesetzt, wodurch die Endprodukte, beispielsweise Produkte einer Milchsäuregärung oder einer alkoholischen Gärung, frei von dem für viele Personen schädlichen Histamin erhalten werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Genussmitteln und Futtermitteln, die arm an Histamin oder Histamin-frei sind, dadurch gekennzeichnet, dass man die auf dem Ausgangsmaterial vorhandene Mikroorganismenflora abtötet und anschliessend während irgendeiner Stufe der Herstellung des Nahrungsmittels, Genussmittels oder Futtermittels einen Mikroorganismus oder ein entsprechendes Enzym zugibt, welches vorhandenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der zugegebene Mikroorganismus ein Bakterium, vorzugsweise aus der Klasse der Mikrokokken, der Pseudomonas Spezies und Lactobacillen, ein Pilz oder eine Hefe, vorzugsweise eine Saccharomyces-Spezies, ist oder dass man ein aus einem derartigen Mikroorganismus gewonnenes Enzym zusetzt, welches Histidin ohne Bildung von Histamin durch Transaminierung oder Desaminierung abbaut.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismus oder ein Enzym zusetzt, das vorhandenes Histidin unter Bildung von Glutaminsäure bzw. Ketoglutarsäure oder entsprechenden Salzen abbaut.

4. Verfahren nach einem der Patentansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nahrungsmittel, Genussmittel oder Futtermittel herstellt, wobei ein wesentlicher Schritt des Herstellungsverfahrens eine durch Mikroorganismen hervorgerufene Umwandlung, beispielsweise eine alkoholische Gärung oder Milchsäuregärung, ist, indem man nach der Abtötung der Keimflora des Ausgangsmaterials die Umwandlung mit einer solchen Reinkultur eines Mikroorganismenstamms durchführt, der außerdem vorhandenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

5. Verfahren nach einem der Patentansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nahrungsmittel, Genussmittel oder Futtermittel herstellt, wobei ein wesentlicher Schritt des Herstellungsverfahrens eine durch Mikroorganismen hervorgerufene Umwandlung, beispielsweise eine alkoholische Gärung oder eine Milchsäuregärung, ist, indem man nach der Abtötung der Keimflora des Ausgangsmaterials in dem Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin mit Hilfe eines entsprechenden Mikroorganismus oder eines daraus gewonnenen Enzyms ohne Bildung von Histamin abbaut, so dass bei der nachfolgenden durch den Mikroorganismus hervorgerufenen wesentlichen Umwandlung des Ausgangsmaterials in diesem praktisch kein Histidin mehr vorhanden ist oder während der Umwandlung gebildetes Histidin durch den ersten Mikroorganismus oder das Enzym sofort ohne Bildung von Histamin abgebaut wird, so dass kein Histidin vorhanden ist, das durch den zweiten Mikroorganismus über eine Histidin-Decarboxylierung zu Histamin umgewandelt werden kann.

6. Verfahren nach Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man ein alkoholisches Getränk, beispielsweise Bier, Wein oder Spirituosen, oder ein aus einem durch alkoholische Gärung erzeugten Produkt erhaltenes alkoholfreies Sekundärprodukt, beispielsweise alkoholfreies Bier oder Essig, herstellt, indem nach der Abtötung der Keimflora des Ausgangsmaterials die alkoholische Gärung durch Beimpfung mit einer solchen Reinkultur eines Hefestammes, insbesondere einer Saccharomyces-Spezies, durchführt, welcher neben der alkoholischen Gärung im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

7. Verfahren nach Patentanspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man ein alkoholisches Getränk, beispielsweise Bier, Wein oder Spirituosen, oder ein aus einem durch alkoholische Gärung erzeugten Produkt erhaltenes alkohol-

freies Sekundärprodukt, beispielsweise ein alkoholfreies Bier oder einen Tafelessig, herstellt, indem man nach der Abtötung der Keimflora des Ausgangsmaterials eine solche Reinkultur eines Mikroorganismus oder ein Enzym zusetzt, das im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut und nach erfolgtem Histidinabbau die alkoholische Gärung durch Beimpfung mit einer Hefekultur durchführt, die gegebenenfalls auch ein Hefestamm sein kann, der vorhandenes Histidin zu Histamin decarboxylieren würde.

8. Verfahren nach Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der zum Histidinabbau verwendete Mikroorganismus eine Reinkultur eines Lactobacillus ist, insbesondere eine Reinkultur von Lactobacillus delbrückii, die Milchsäure bildet, und das durch Proteolyse entstandene Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut, worauf man dann nach erfolgtem Histidinabbau die alkoholische Gärung durch Beimpfung mit einer Hefereinkultur durchführt, die Ammoniak und Glutaminsäure sowie die durch den Lactobacillus gebildete Milchsäure mindestens teilweise abbaut.

9. Verfahren nach Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nahrungsmittel, Genussmittel oder Futtermittel herstellt, bei dem ein wesentlicher Schritt des Herstellungsverfahrens eine Milchsäuregärung ist, beispielsweise ein Sauermilchprodukt, eine Joghurt, einen Quark, ein Sauerkraut oder ein Silofutter erzeugt, indem man nach der Abtötung der Keimflora des Ausgangsmaterials die Milchsäuregärung durch Beimpfung mit einer solchen Mikroorganismenreinkultur, vorzugsweise Lactobacillus-Reinkultur, durchführt, die im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut, beispielsweise mit einer entsprechenden Reinkultur von Lactobacillus helveticus oder Lactobacillus bulgaricus oder Lactobacillus acidophilus und speziell bevorzugt von Lactobacillus delbrückii.

10. Verfahren nach Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das hergestellte Nahrungsmittel ein Käse ist, wobei nach der Abtötung der Keimflora des als Ausgangsmaterial dienenden Quarks oder des durch Labzugabe erzeugten Milchkoagulates die Käseherstellung durch Beimpfung mit mindestens einer Mikroorganismen-Reinkultur durchgeführt wird, die im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

11. Nach dem Verfahren gemäß Patentanspruch 1 hergestellte Nahrungsmittel, Genussmittel oder Futtermittel, welche arm an Histamin oder Histamin-frei sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Genussmitteln und Futtermitteln, die arm an Histamin oder vollständig frei von Histamin sind. Des weiteren betrifft die Erfindung die nach diesem Verfahren hergestellten Nahrungsmittel, Genussmittel und Futtermittel.

In den letzten Jahren sind immer stärkere Anstrengungen unternommen worden, um in Nahrungsmitteln, Genussmitteln und Futtermitteln den Gehalt an gesundheitsschädlichen Substanzen, wie zum Beispiel Pflanzenschutzmitteln, Schwermetallen, Mycotoxinen, Nitrosaminen und anderen Karzinogenen, möglichst weitgehend zu senken und im Idealfall die Nahrungsmittel, Genussmittel und Futtermittel überhaupt frei von derartigen Substanzen zu halten. Bei Futtermitteln ist es deshalb so besonders wichtig, sie möglichst frei von Schadstoffen zu halten, weil die Schadstoffe sowohl in den Geweben der Tiere, also im Fleisch, angesammelt werden können als auch eine Anreicherung der Schadstoffe

in der Milch der Tiere, also insbesondere in Kuhmilch und daraus hergestellten Produkten, häufig vorkommt.

Es ist bekannt, dass der Genuss von bestimmten Nahrungsmitteln, insbesondere von bestimmten alkoholischen Getränken wie Wein und Bier sowie von Käse und auch von Sauerkraut, zu Migräne und Kopfschmerzen führen kann und dass derartige Nahrungsmittel und Genussmittel auch für Menschen unbekömmlich sind, die an Allergien, Diarrhoe sowie an Magen- und an Zwölffingerdarm-Geschwüren leiden.

Untersuchungen, die im Zusammenhang mit diesen erwähnten Wirkungen an Bier durchgeführt wurden, scheinen zu zeigen, dass obergärtige Typen häufiger Störungen hervorufen als untergärtige Typen. Dennoch hängt die Stärke der Störungen mehr von der konsumierten Biermenge als vom gewählten Biertyp (Pilsener, Export usw.) ab. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass bei Bieren mit gleichem Gehalt an Alkohol, an Fuselölen und an Hopfenextraktstoffen die erwähnten unerwünschten Wirksamkeiten stark wechselnd sein können. Es zeigte sich jedoch, dass Biere mit hohem Eiweissgehalt und Aminosäuregehalt unbekömmlicher sind als Biere mit geringerem Eiweissgehalt.

Histamin und andere biogene Amine gelangen meist erst während der Verarbeitung von landwirtschaftlichen Primärprodukten in das Lebensmittel hinein.

Es hat sich nun gezeigt, dass zahlreiche Mikroben in der Lage sind, das in landwirtschaftlichen Primärprodukten auftretende Histidin zu dem biogenen Amin Histamin zu decarboxylieren.

Histamin ist eine Substanz, die schon in geringsten Mengen starke physiologische Reaktionen beim Menschen auslöst, wie zum Beispiel Kopfschmerz (Migräne), Übelkeit und Diarrhoe. Außerdem ist Histamin ein wesentlicher Faktor bei Allergien und Anaphylaxie.

Histamin ist eine starke Base, die mit Säuren Salze bildet. Das Histamin kommt in Pflanzen, beispielsweise im Spinat und in Brennesseln, vor und ist in verschiedenen tierischen Geweben und menschlichem Gewebe zu finden. Basophile Leukozyten speichern Histamin in inaktiver Form, es kann jedoch aus diesen durch allergische Reaktionen oder durch ionisierende Strahlung oder bei Gewebszerstörung oder auch durch Liberatoren freigesetzt werden.

Es wird auch angenommen, dass eine enge Beziehung zwischen dem Histamingehalt der Magenschleimhaut, dem Ulkusrezidiv und der Magensäure besteht. Durch Verabreichung von Histaminrezeptor-Antagonisten können chronische Magengeschwüre signifikant gebessert werden. Dasselbe gilt auch für die Migräne. Zur Migräneprophylaxe ist eine bekömmliche histaminfreie Kost von grosser Bedeutung.

Personen mit chronischem Zwölffingerdarmgeschwür speichern signifikant weniger Histamin in der Korpus-schleimhaut als magengesunde Personen. Während gesunde Personen mit der Nahrung zugeführtes Histamin durch eine Histaminase abbauen, kommt es bei Fehlen dieses Fermentes zu Histamin-Kopfschmerz (Horton Syndrom), das auch Histaminzephalgie genannt wird. Auch das Bing-Kopf-schmerz-Syndrom und die Harris Neuralgie, eine meist zu bestimmten Tageszeiten, vorwiegend nachts, gehäuft auftretende Störung durch halbseitige Schmerzzattacken im Augen-, Stirn-, Schläfenbereich mit Tränenfluss, Rötung des Auges und des Gesichtes, Schwellung der Nasenschleimhaut usw., wird durch Histamin ausgelöst und kann erfolgreich mit Antihistaminika behandelt werden.

Desensibilisierung und Erzeugung einer erhöhten Resistenz gegen Histamin wird durch Verabreichung von Histaminazoprotein erreicht. Normalerweise findet sich im Serum ein Antihistaminfaktor, dessen Fehlen als Zeichen einer latenten Allergie aufgefasst wird.

Die Ausscheidung des Histamins erfolgt durch den Stuhl und mit dem Harn.

Histamin steigert die Kontraktion der glatten Muskulatur und lässt Gefäßmuskeln erschlaffen. Auf diese Weise wird der Blutdruck gesenkt, aber die Kapillarpermeabilität erhöht, so dass es zu Bildung von Quader und Ödemen in der Haut kommt. Das menschliche Serum kann freies Histamin binden. Nur beim Allergiker ist das Bindungsvermögen stark vermindert, es wird durch ein sogenanntes Antipexin gehemmt.

Als gesundheitsgefährdende Toleranzgrenze werden von Marquardt (siehe H. Marquardt, «Die Weinwirtschaft», S. 127, 1978), 2 mg Histamin pro Kilogramm Lebensmittel oder Genussmittel, beispielsweise Wein, angesehen.

Es wurden nun verschiedene Nahrungsmittel und Ge-nussmittel auf ihren Gehalt an Histamin überprüft. Bei Molkereiprodukten erhielt man dabei die in der folgenden Tabelle I zusammengestellten Ergebnisse:

Tabelle I
Histamingehalt in verschiedenen Molkereiprodukten

Erzeugnis	Histamin mg/kg
Pasteurisierte V-Milch	0,3
Pasteurisierte V-Milch	0,5
Pasteurisierte V-Milch	0,7
H – Vollmilch	0,8
H – Vollmilch	0,8
Dikmelk	1,2
Joghurt	2,1
Joghurt	1,7
Tilsiterkäse Vollf.	50,0
Tilsiterkäse Vollf.	60,2
Gouda-Käse Vollf.	54,0
Gouda-Käse Vollf. österr.	41,0
Gouda-Käse Vollf. holl.	180,0
Camembert Vollf.	35,0
Camembert Vollf.	55,0
Stilton Vollf. engl.	158,0
Harzer-Käse	390,0
Harzer-Bauernkäse	383,0

Wie man aus dieser Tabelle sieht, liegt der Histamingehalt von verschiedenen Vollmilcharten deutlich unterhalb der von Marquardt angegebenen Toleranzgrenze. Es ist an und für sich überraschend, dass Frischmilch bereits eine gewisse Histaminmenge aufweist. Man kann annehmen, dass zumindest teilweise dieser Histamingehalt der Frischmilch darauf zurückzuführen ist, dass von den Kühen mit den Futtermitteln, und zwar insbesondere mit Silofutter, Histamin aufgenommen wird und dieses in die Milch übergeht. Wie man aus der Tabelle I weiter sieht, ist jedoch der Histamingehalt von Sauermilchprodukten, wie Joghurt, und von Käsen wesentlich höher als derjenige von Frischmilch. Da Mikroorganismen, wie bereits weiter vorne erwähnt ist, in der Lage sind, das in Milcheiweiß enthaltene Histidin durch Decarboxylierung in Histamin umzuwandeln, tritt bei der Säuerung der Milch und bei der Käseherstellung diese drastische Erhöhung im Histamingehalt auf. Beim Verzehr von nur 50 g Harzer-Bauernkäse werden bereits nahezu 20 mg Histamin aufgenommen, also die 10fache Menge, die von Marquardt als Toleranzgrenze für 1 kg Getränk, wie Wein, angesehen wird.

Auch Weine weisen einen ziemlich hohen Histamingehalt auf, und zwar insbesondere Rotwein und Champagner.

Auch in diesem Fall wird das Histamin, wie in der Folge noch näher diskutiert wird, dadurch gebildet, dass Histidin aus Eiweissstoffen, die im Most oder in der Maische enthalten sind, durch Mikroorganismen in Histamin umgewandelt wird. Die bei der Weinuntersuchung erzielten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II
Histamingehalt verschiedener Weine

Erzeugnis	Histamin mg/kg
Tafelwein (Mosel)	0,5
Tafelwein (Frankr.)	1,6
Qualitätswein (Mosel)	1,1
Kabinettwein (Rheinhessen)	3,0
Kabinettwein (Rheinhessen)	4,5
Auslese (Rheingau)	1,7
Rotwein (Ahr)	5,6
Tokaier (Ungarn)	1,1
Tokaier, trocken (Ungarn)	3,2
Rotwein (Österreich)	7,4
Sekt, trocken (Deutschland)	5,1
Champagner (Frankreich)	7,8

Bei den Bieruntersuchungen hat man, wie bereits weiter vorne klargelegt wurde, festgestellt, dass eiweissreiche Biere unbekömmlicher sind als solche mit geringem Eiweiss- oder Aminosäuregehalt. Die Überprüfung des Histamingehaltes in diesen Biere ergab, dass die eiweissreichen Biere auch besonders reich an Histamin sind und dass selbst alkoholfreie Biere relativ grosse Histamingehalte aufweisen können.

In der folgenden Tabelle III sind die Histamingehalte verschiedener Biere zusammengestellt, und es werden in dieser Tabelle auch die Versuchsnummern angegeben.

Tabelle III
Histamingehalt verschiedener Biere

Nr.	Bier Typ	Histamin mg/l
1	Alt-	4,5
2	Alt-	9,8
3	Alt-	8,0
4	Alt-	6,8
5	Alt-	5,0
6	Weiss-	5,3
7	Weiss-	4,9
8	Weiss-	4,0
9	Weiss-	4,7
10	Malz-	6,8
11	alkoholfrei	7,5
12	alkoholfrei	4,6
13	Export-	3,2
14	Export-	2,9
15	Export-	11,2
16	Export-	7,0
17	Export-	6,6
18	Export-	7,2
19	Pils-	3,5
20	Pils-	0,2
21	Pils-	7,4
22	Pils-	5,8
23	Pils-	5,2
24	Pils-	5,9
25	Pils-	8,7

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass man Nahrungsmittel, Genussmittel und Futtermittel herstellen kann, die arm an Histamin oder Histamin-frei sind, indem man nach der Abtötung der auf dem Ausgangsmaterial vor-

ten sind, durch Mikroorganismen in Histamin umgewandelt wird. Die bei der Weinuntersuchung erzielten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle II zusammengestellt.

25 handenen Mikroorganismenflora dem Ausgangsmaterial einen solchen Mikroorganismus oder ein entsprechendes Enzym zugibt, welches vorhandenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein 30 Verfahren zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Genussmitteln und Futtermitteln, die arm an Histamin oder Histamin-frei sind, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man die auf dem Ausgangsmaterial vorhandene Mikroorganismenflora abtötet und anschliessend während irgen-

35 deiner Stufe der Herstellung des Nahrungsmittels, Genussmittels oder Futtermittels einen Mikroorganismus oder ein entsprechendes Enzym zugibt, welches vorhandenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

40 Bei einer bevorzugten Ausführungsart des erfindungsge- mässen Verfahrens wird als Mikroorganismus ein Bakterium, vorzugsweise aus der Klasse der Mikrokokken, der Pseudomonas Spezien und Lactobacillen, ein Pilz oder eine Hefe, vorzugsweise eine Saccharomyces-Spezies, zugesetzt 45 oder ein aus einem derartigen Mikroorganismus gewonnenes Enzym zugesetzt, welches Histidin ohne Bildung von Histamin durch Transaminierung oder Desaminierung abbaut. Im allgemeinen wird dabei das vorhandene Histidin unter Bildung von Glutaminsäure und/oder Ketoglutarsäure bzw. 50 Salzen dieser Säuren abgebaut.

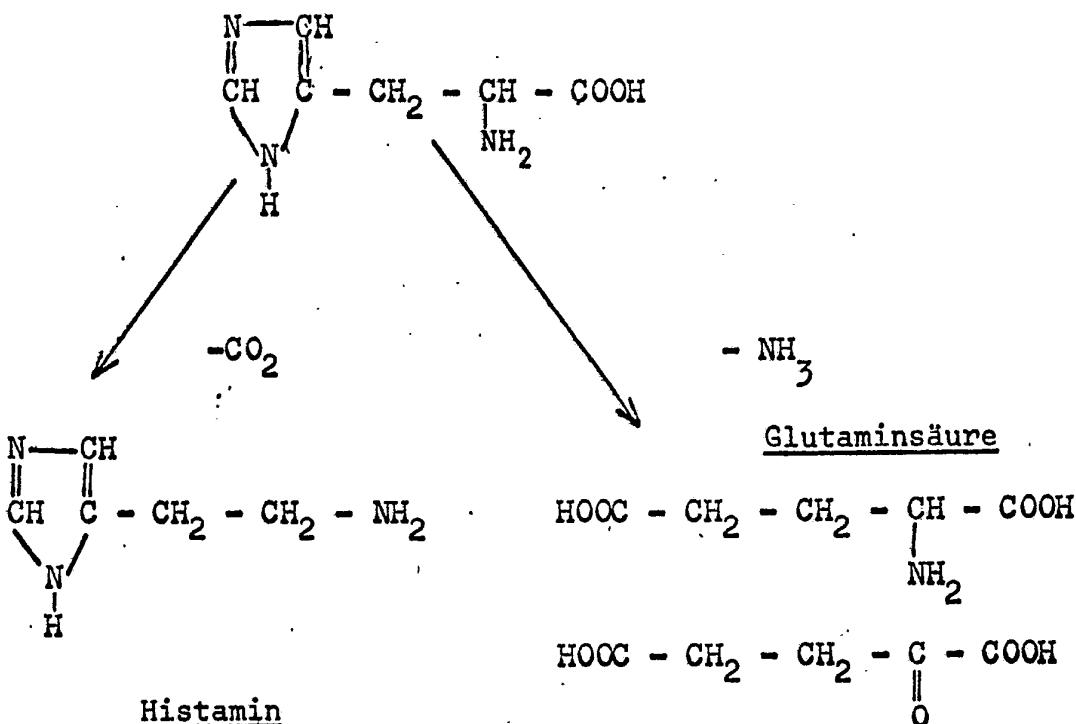
Während nämlich in der natürlich vorkommenden Mi- kroorganismenpopulation hauptsächlich solche Stämme an- zutreffen sind, die Histidin in der unerwünschten Weise un- ter Bildung von Histamin abbauen, so zeigte es sich jetzt

55 überraschenderweise, dass in der natürlich vorkommenden Mikroorganismenpopulation auch eine kleine Anzahl an Stämmen vorkommen kann, die Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut, und auch bei den Sammelstellen für Mi- kroorganismen können solche hinterlegten Reinkulturen

60 von Mikroorganismen bezogen werden, die Histidin ohne Bildung von Histamin abbauen.

Anhand des folgenden Reaktionsschemas wird der uner- wünschte Histidinabbau, der über eine Decarboxylierung

65 Histamin liefert, und auch ein erwünschter Histidinabbau, der über eine Desaminierung die unschädlichen Nebenprodukte Glutaminsäure und/oder Ketoglutarsäure liefert, erläutert:

HistidinKetoglutaric acid

Aufgrund der Tatsache, dass in der natürlich vorkommenden Mikroorganismenpopulation hauptsächlich solche Stämme vorhanden sind, die Histidin unter Bildung von Histamin abbauen, ist das erfundungsgemäße Verfahren dort besonders wichtig, wo im Zuge der Herstellung eines Nahrungsmittels, Genussmittels oder Futtermittels eine durch Mikroorganismen hervorgerufene Umwandlung stattfindet, weil es jetzt mit Hilfe des erfundungsgemäßen Verfahrens möglich wird, die bei diesen Herstellungsverfahren gebildeten Produkte Histamin-frei zu erhalten, indem man nämlich eine solche Reinkultur eines Mikroorganismus einsetzt, der Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

Wenn man das erfundungsgemäße Verfahren bei der Herstellung eines Nahrungsmittels, Genussmittels oder Futtermittels anwendet, bei welcher ein wesentlicher Schritt eine durch Mikroorganismen hervorgerufene Umwandlung ist, dann sind zwei besonders vorteilhafte Ausführungsarten des erfundungsgemäßen Verfahrens möglich.

Gemäß der einen bevorzugten Ausführungsart des erfundungsgemäßen Verfahrens wird nach der Abtötung der Keimflora des Ausgangsmaterials die Umwandlung mit einer solchen Reinkultur eines Mikroorganismenstammes durchgeführt, der außerdem vorhandenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut. Die mit der Reinkultur des Mikroorganismenstammes im Ausgangsmaterial durchgeführte Umwandlung kann dabei beispielsweise eine alkoholische Gärung oder eine Milchsäuregärung sein.

Wenn man nach dieser bevorzugten Ausführungsart des erfundungsgemäßen Verfahrens ein alkoholisches Getränk, beispielsweise Bier, Wein oder Spirituosen, oder ein aus einem durch alkoholische Gärung erzeugten Produkt erhaltenes alkoholfreies Sekundärprodukt, beispielsweise alkoholfreies Bier oder Tafelessig, herstellt, dann wird nach

der Abtötung der Keimflora des Ausgangsmaterials die alkoholische Gärung durch Beimpfung mit einer solchen Reinkultur eines Hefestammes, insbesondere einer *Saccharomyces*-Spezies, durchgeführt, welcher neben der alkoholischen Gärung im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

Wenn man nach dieser einen bevorzugten Ausführungsart des erfundungsgemäßen Verfahrens ein Nahrungsmittel, Genussmittel oder Futtermittel herstellt, bei dem ein wesentlicher Schritt des Herstellungsverfahrens eine Milchsäuregärung ist, beispielsweise ein Sauermilchprodukt, eine Joghurt, einen Quark, ein Sauerkraut oder ein Silofutter erzeugt, dann erfolgt nach der Abtötung der Keimflora des Ausgangsmaterials die Milchsäuregärung durch Beimpfung mit einer solchen Mikroorganismen-Reinkultur, vorzugsweise *Lactobacillus*-Reinkultur, die im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut. Beispiele für entsprechende Reinkulturen sind solche von *Lactobacillus helveticus* oder *Lactobacillus bulgaricus* oder *Lactobacillus acidophilus*, und speziell bevorzugt von *Lactobacillus delbrückii*.

Die oben beschriebene Ausführungsart des erfundungsgemäßen Verfahrens ist auch bei der Käseherstellung anwendbar. In diesem Falle wird nach der Abtötung der Keimflora des als Ausgangsmaterial dienenden Quarkes oder des durch Labzugabe erzeugten Milchkoagulates die Käseherstellung durch Beimpfung mit mindestens einer Mikroorganismen-Reinkultur durchgeführt, die im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

Gemäß der anderen bevorzugten Ausführungsart des erfundungsgemäßen Verfahrens erfolgt eine Herstellung eines Nahrungsmittels, Genussmittels oder Futtermittels nach einem Herstellungsverfahren, in welchem ein wesentlicher

Schritt eine durch Mikroorganismen hervorgerufene Umwandlung ist, beispielsweise eine alkoholische Gärung oder eine Milchsäuregärung, indem man nach der Abtötung der Mikroorganismenflora des Ausgangsmaterials in dem Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin mit Hilfe eines entsprechenden Mikroorganismus oder eines daraus gewonnenen Enzyms ohne Bildung von Histamin abbaut, so dass bei der nachfolgenden, durch den Mikroorganismus hervorgerufenen wesentlichen Umwandlung des Ausgangsmaterials in diesem praktisch kein Histidin mehr vorhanden ist oder während der Umwandlung gebildetes Histidin durch den ersten Mikroorganismus oder das Enzym sofort ohne Bildung von Histamin abgebaut wird, so dass kein Histidin vorhanden ist, das durch den zweiten Mikroorganismus über eine Histidin-Decarboxylierung zu Histamin umgewandelt werden kann.

Wird nach dieser zweiten bevorzugten Ausführungsart des erfundungsgemässen Verfahrens ein alkoholisches Getränk, beispielsweise Bier, Wein oder Spirituosen, oder ein aus einem durch alkoholische Gärung erzeugten Produkt erhaltenes alkoholfreies Sekundärprodukt, beispielsweise ein alkoholfreies Bier oder einen Tafelessig, hergestellt, dann wird nach der Abtötung der Keimflora des Ausgangsmaterials eine solche Reinkultur eines Mikroorganismus oder ein Enzym zugesetzt, das im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut, und nach erfolgtem Histidinabbau die alkoholische Gärung durch Beimpfung mit einer Hefekultur durchgeführt wird, die gegebenenfalls auch ein Hefestamm sein kann, der vorhandenes Histidin zu Histamin decarboxylieren würde. In diesem Falle ist der zum Histidinabbau verwendete Mikroorganismus vorzugsweise eine Reinkultur eines Lactobacillus, insbesondere eine Reinkultur von Lactobacillus delbrückii, die Milchsäure bildet und das durch Proteolyse entstandene Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut, worauf dann nach erfolgtem Histidinabbau die alkoholische Gärung zweckmässigerweise durch Beimpfung mit einer Hefe-Reinkultur durchgeführt wird, die Ammoniak und Glutaminsäure sowie die durch den Lactobacillus gebildete Milchsäure mindestens teilweise abbaut.

Um festzustellen, ob eine Mikroorganismen-Reinkultur, beispielsweise ein von einer Sammelstelle bezogener Mikroorganismenstamm, Histidin in der gewünschten Weise abbaut oder nicht, muss man lediglich diesen Mikroorganismenstamm in einem geeigneten Nährmedium züchten und diesem Histidin zusetzen. Sobald der Mikroorganismenstamm dann in diesem Nährmedium eine Zeitlang gewachsen ist, wird dann in dem Nährmedium der Histamingehalt bestimmt. Dies wurde nach der fluorimetrischen Methode durchgeführt, die in der Veröffentlichung von P. A. Shore et al. im J. pharmacol. exp. Ther. 127, 183 (1979) beschrieben ist. Dieses Verfahren besitzt eine hohe Empfindlichkeit, und es ist für Histamin spezifisch. Es wird dabei eine Kondensation von o-Pthal-aldehyd mit gegebenenfalls vorhandenem Histamin durchgeführt, wobei das Reaktionsprodukt aus dem Aldehyd und dem Histamin eine starke beständige Fluoreszenz nach einer Anregung mit einer Strahlung von 360 nm aufweist. Die Fluoreszenz wird bei 150 nm bestimmt. Ein Vorteil dieses Verfahrens zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Histidin besteht darin, dass es sehr spezifisch ist, wobei die Anwesenheit nahe verwandter Verbindungen, wie zum Beispiel von n-Alkylhistamin, Acetylhistamin, Serotonin und ähnlichen Verbindungen, dieses Nachweisverfahren nicht stört.

Im vorliegenden Fall wird die Bestimmung des Histamines in Zuchtmitteln oder in Verfahrensprodukten, und zwar sowohl Produkten, die nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellt wurden, als auch Produkten, die nach ei-

nem Verfahren zu Vergleichszwecken hergestellt wurden, durchgeführt, indem man zunächst zu dem organischen Material, in dem der Histamingehalt festgestellt werden soll, Perchlorsäure zugibt. Anschliessend wird dann die 5 Schicht alkalisch gemacht und mit n-Butanol extrahiert. Die organische Schicht wird abgetrennt, und aus dieser wird das Histamin mit einem sauren wässrigen Medium ausgeschüttet. In diesem sauren wässrigen Medium wird es dann mit dem o-Pthal-aldehyd kondensiert, und anschliessend erfolgt die Anregung der Fluoreszenz und die Messung der 10 Fluoreszenz bei 150 nm. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenz dieser sauren Lösung während mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde beständig ist und dass die Intensität der Fluoreszenz um so höher ist, je höher der Histamingehalt der Probe ist. Nach diesem 15 Verfahren können Histaminkonzentrationen in dem wässrigen sauren Medium bestimmt werden, die im Bereich von 0,005 bis 0,5 g/ml liegen. Unter Verwendung von Eichkurven kann der Histamingehalt der Probe direkt abgelesen werden. Um die Verlässlichkeit dieses Verfahrens zu überprüfen, wurden verschiedenen Produkten, beispielsweise 20 Sauerkraut, Wein, Bier und Milchprodukten, gemessene, sehr geringe Mengen an Histamin zugesetzt, und es zeigte sich, dass 95–100 Gew.-% des zugegebenen Histamines nach diesem Testverfahren bestimmt werden konnten.

25 Wenn man nach dem erfundungsgemässen Verfahren beispielsweise eine Milchsäuregärung durchführen will, dann kann man aus entsprechenden technischen Kulturen von Lactobacillus helveticus oder Lactobacillus bulgaricus oder Lactobacillus acidophilus Einzellkulturen isolieren und diese 30 in einer geeigneten Nährösung unter Zusatz von Pantothenäure, Niacin, Riboflavin und Calcium vermehren. Die so erhaltenen wirklichen Reinkulturen der vorgenannten Mikroorganismen haben ein Optimum der Gärungstemperatur im Bereich von 40–44 °C, wobei die maximalen Temperaturen, bei welchen eine Vergärung mit diesen Mikroorganismen möglich ist, im Bereich von 50–52 °C liegt. Die oben erwähnten Reinkulturen des Lactobacillus helveticus bzw. Lactobacillus bulgaricus bzw. Lactobacillus acidophilus vergären Glucose und Maltose homofermentativ unter Bildung 35 von d(–)Milchsäure, jedoch ohne Bildung von Kohlendioxid. Diese fraglichen Mikroorganismen desaminieren Histidin und einige weitere Aminosäuren wie Arginin, Citrullin, Ornithin, Prolin und Hydroxyprolin unter Freisetzung von Ammoniak.

40 45 Es sei in diesem Zusammenhang ausdrücklich darauf hingewiesen, dass eine grosse Anzahl an Mikroorganismenstämmen, beispielsweise Lactobacillusstämmen, die bei üblichen Sammelstellen hinterlegt sind, in der Lage sind, die gewünschte Desaminierung von Histidin unter Freisetzung von Ammoniak durchzuführen. Sofern Reinkulturen dieser 50 hinterlegten Stämme die erwähnte Eigenschaft besitzen, sind sie zur Durchführung des erfundungsgemässen Verfahrens geeignet.

In der gleichen Weise, wie dies oben für den Lactobacillus helveticus und die anderen genannten Lactobacillusstämme beschrieben ist, wurde ferner auch eine «Einzellkultur» des Lactobacillus delbrückii hergestellt.

Wenn nun mit den so erhaltenen Einzellkulturen des Lactobacillus eine Milchsäuregärung durchgeführt wird, 60 dann wird zusätzlich zu der Bildung der Milchsäure auch in dem Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin nach einer primären Ammoniakabspaltung in Glutaminsäure umgewandelt, und es findet keine unerwünschte Umwandlung von Histidin unter Kohlendioxidabspaltung statt, die zu dem unerwünschten Histamin führt.

65 Wird nun eine sterilisierte Süßmilch mit den vorhin beschriebenen Einzellkulturen von Lactobacillus helveticus oder Lactobacillus bulgaricus oder Lactobacillus acido-

philus beimpft und die Milchsäuregärung bei einer Temperatur im Bereich von 40–45 °C durchgeführt, dann erhält man eine Sauermilch, die praktisch vollständig frei von Histamin ist bzw. deren Histamingehalt nicht höher ist als derjenige der zur Sauermilch-Herstellung verwendeten Frischmilch. Im allgemeinen ist es vorteilhaft, zur Gewährleistung einer Optimierung der Wachstumsbedingungen während der Milchsäuregärung der als Ausgangsmaterial verwendeten Milch noch Pantothenensäure, Niacin und Riboflavin zuzusetzen. Ein wesentlicher mineralischer Bestandteil, den die Reinkulturen des *Lactobacillus helveticus* oder *Lactobacillus bulgaricus* oder *Lactobacillus acidophilus* für ihr Wachstum benötigen, ist Calcium. Jedoch enthält Frischmilch bereits ausreichende Mengen an Calcium, so dass sich bei der hier beschriebenen Sauermilch-Herstellung die Zugabe von Calcium erübriggt.

Aus der so erhaltenen Sauermilch kann man, falls erwünscht, auch einen histaminfreien Quark herstellen, und dieser kann entweder als solcher verkauft werden oder er kann zur Herstellung bestimmter Käsesorten verwendet werden, wie zum Beispiel zur Herstellung von Mainzer-Handkäse oder Olmützer Quargeln, oder auch von Harzkäse.

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhaltene Einzellkultur des *Lactobacillus delbrückii* wurde verwendet, um Sauerkraut, saure Gurken und Silofutter mit verminderinem Histamingehalt oder überhaupt histaminfrei herzustellen.

Bei der Herstellung von Sauerkraut wird der entsprechend zerkleinerte Weisskohl wie üblich gewürzt und dann jedoch nicht durch die Einwirkung der auf ihm befindlichen Milchsärebakterien vergoren, sondern durch thermische Behandlung wird die vorhandene Keimflora zerstört, und anschliessend erfolgt die künstliche Beimpfung mit dem Histidin zur Glutaminsäure umwandelnden *Lactobacillus delbrückii*-Stamm, und das so beimpfte Material wird in üblicher Weise zu Sauerkraut weiterverarbeitet.

In gleicher Weise wird auch bei der Herstellung von sauren Gurken zuerst eine Sterilisierung des Ausgangsmaterials und nachträglich eine Beimpfung vorgenommen.

Wie bereits erwähnt wurde, ist das erfundengemäss Verfahren bei der Herstellung von Gärfutter, also sogenanntem Silofutter, von grosser Bedeutung. In diesem Falle wird das als Ausgangsmaterial verwendete Grünfutter, beispielsweise Gras, Luzerne, Grünmais und ähnliches, vorerst durch Hitzebehandlung keimfrei gemacht und dann künstlich mit der erwähnten Einzell-Reinkultur des *Lactobacillus delbrückii* beimpft und in üblicher Weise in den zu diesem Zweck vorgesehenen wasserdichten Behältern, also den üblichen Futtersilos, vergoren. In gleicher Weise wird Silofutter aus Vorwellsilage hergestellt, wobei nach der Zugabe von zuckerhaltigen Stoffen, beispielsweise Melasse oder Rübenschitzeln, zu der Vorwellsilage dann diese Mischung zuerst keimfrei gemacht und dann künstlich mit der erwähnten Einzell-Reinkultur des *Lactobacillus delbrückii* beimpft wird. Das auf diese Weise hergestellte histaminfreie oder histaminarme Silofutter ist überaus wünschenswert, weil bei seiner Verfütterung an Kühe verhindert wird, dass mit dem Futter aufgenommenes Histamin in die Milch übergeht. Bei Verwendung eines derartigen Silofutters gelingt es, praktisch histaminfreie Frischmilch zu produzieren.

Wenn die durch Mikroorganismen hervorgerufene Umwandlung eine alkoholische Gärung ist, dann kann man die Bildung eines histaminfreien alkoholischen Vergärungsproduktes wie bereits erwähnt dadurch erreichen, dass man das Ausgangsmaterial zunächst sterilisiert und dann eine entsprechende Gärung mit einem solchen *Saccharomyces*-Stamm durchführt, der eine Transaminierung oder Desami-

nierung von im Ausgangsmaterial enthaltenem Histidin bewirkt.

Es ist möglich, auf diese Weise einen Wein herzustellen, indem man den Most zunächst sterilisiert und dann mit einer 5 Einzell-Reinkultur von *Saccharomyces* beimpft. Dadurch wird bei der alkoholischen Gärung im Ausgangsmaterial vorhandenes Histidin transaminiert oder desaminiert und nicht in schädliches Histamin umgewandelt. Da jedoch die erwähnten Einzell-Reinkulturen von *Saccharomyces* häufig 10 nicht optimal zur Durchführung der alkoholischen Gärung geeignet sind, sind die weiter hinten beschriebenen Verfahrensweisen zur Weinherstellung, bei denen zuerst im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin durch andere Mikroorganismen entfernt wird und dann erst die alkoholische Gärung 15 erfolgt, im allgemeinen vorteilhafter. Auch die Sekundärgärung bei der Champagnerherstellung wird im allgemeinen nicht mit einem speziell ausgewählten Hefestamm, sondern durch Zugabe von *Lactobacillus*-Reinkulturen durchgeführt, wie dies ebenfalls weiter hinten noch im Detail 20 erläutert wird.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, sind manche Käsesorten besonders reich an Histamin. Die Schwierigkeit bei der Käseherstellung nach dem erfundengemässen Verfahren besteht darin, dass bei vielen Käsen nicht ein einziger 25 Mikroorganismus für die Bildung des speziellen Hartkäses oder Weichkäses verantwortlich ist, sondern dass mehrere unterschiedliche Mikroorganismen bei der Herstellung einer speziellen Käsesorte mitwirken können. Wenn man nun nach dem erfundengemässen Verfahren einen histaminarmen Käse herstellen will, dann müssen aus allen für die Herstellung der speziellen Käsesorte verantwortlichen Mikroorganismenstämmen solche Einzellkulturen herausgezüchtet werden, die zu einer Transaminierung oder Desaminierung 30 von Histidin führen.

Der Roquefort-Käse wird bekanntlich durch Einwirkung eines bestimmten blauen Schimmelpilzes auf Bruch hergestellt, der aus Schafmilch durch Fällung von Lab gewonnen wurde. Während bei der traditionellen Roquefort-Herstellung durch einen Zusatz von verschimmeltem Brot eine Infektion des Bruches mit dem blauen Schimmelpilz erfolgt, wurde nunmehr aus dem blauen Schimmel des Roquefort-Käses eine Einzellkultur herausgezüchtet, die zu einer Desaminierung des Histidines führte. Der Käsebruch wurde dann mit dieser blauen Schimmel-Reinkultur beimpft, und dadurch gelang es, einen Roquefort-Käse herzustellen, der nur ganz geringe Mengen an Histamin enthielt, in geschmacklicher Hinsicht jedoch nach entsprechender Reifung dem in traditioneller Weise hergestellten Roquefort-Käse sehr ähnlich war.

Wenn man ein Nahrungsmittel, Genussmittel oder Futtermittel herstellen will, bei dem ein wesentlicher Schritt des Herstellungsverfahrens eine durch Mikroorganismen hervorgerufene Umwandlung ist, dann ist es, wie bereits erwähnt, nicht unbedingt erforderlich, für diese Umwandlung 55 einen solchen Organismenstamm zu verwenden, der zu keiner Decarboxylierung des Histidines unter Bildung des schädlichen Histamines führt, sondern es ist auch möglich, im Ausgangsmaterial enthaltenes Histidin vorher in unschädliche Produkte umzuwandeln, so dass bei der nachfolgenden Einwirkung des Mikroorganismus überhaupt kein Histidin mehr vorliegt, das durch Decarboxylierung in Histamin umgewandelt werden kann. Wenn beispielsweise das herzustellende Produkt ein alkoholisches Getränk ist, dann kann man ein praktisch histaminfreies Endprodukt 60 auch dadurch erhalten, indem man vor der alkoholischen Gärung die Keimflora des Ausgangsmaterials abtötet, anschliessend einen Mikroorganismus oder ein Enzym zusetzt, das eine Transaminierung oder Desaminierung des im Aus-

gangsmaterial enthaltenen Histidines bewirkt, und dann, sobald das vorhandene Histidin in unschädliche Umwandlungsprodukte abgebaut wurde, die alkoholische Gärung durch Beimpfung mit einer Hefekultur durchführt. Der verwendete Hefestamm kann in diesem Fall auch ein solcher sein, der an sich zu einer Decarboxylierung von Histidin unter Bildung von Histamin führen würde, da jedoch zu diesem Zeitpunkt in dem zu vergärenden Material gar kein Histidin mehr vorliegt, kann keine unerwünschte Umwandlung des Histidines zu Histamin erfolgen.

Diese zuletzt erläuterte Ausführungsart des erfundsgemäßen Verfahrens ist auch bei der Bierherstellung sehr vorteilhaft, weil selbst bei denjenigen Arbeitsschritten, die vor der alkoholischen Gärung stattfinden, eine durch Mikroorganismen hervorgerufene Umwandlung von Histidin in Histamin ablaufen kann. Histidin ist nämlich im Getreideeiweiß, beispielsweise im Gersteneiweiß, in beträchtlichen Mengen enthalten. Nach Souci, Fachmann u. Kraut, Nährwert-Tabellen (Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1977) beträgt der Histidinegehalt von Gerstenmehl 1,4 bis 2,5 g pro Kilogramm Gerstenmehl, und der Histidinegehalt von entspelzter Gerste mit einem Proteingehalt von 97 bis 113 g pro Kilogramm entspricht etwa 1,8 g pro Kilogramm. Während der Malzbereitung findet eine Proteolyse des Getreideeiweißes im Maischbottich und in der Braupfanne statt. Ferner liegen zu diesem Zeitpunkt bereits Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Saccharomyces diastaticus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pastorianus* und *Pediococcus cerevisiae* vor, die zu einer Decarboxylierung des Histidines unter Bildung von Histamin führen können. Bei den fraglichen Mikroorganismen handelt es sich in diesem Fall natürlich nicht um speziell gezüchtete reine Einzell-Kulturen, sondern um die in natürlicher Umgebung vorliegenden Stämme, die eben, wie bereits weiter vorne erläutert wurde, im allgemeinen zu dieser unerwünschten Decarboxylierung des Histidines führen.

Diese mikrobiell bedingte Decarboxylierung des Histidines unter Bildung von schädlichem Histamin kann bei der Bierbereitung erst am Ende des Verzuckerungsvorganges durch thermische Inaktivierung unterbrochen werden, nicht jedoch im Verlaufe der Primärgärung oder während der Reifung. In die Gärbottiche hineingelangte Mikroben, die eine Histidin-Decarboxylierung bewirken, wozu auch zahlreiche Rassen von *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage sind, lassen so beträchtliche Histamin-Mengen entstehen.

Es hat sich nun überraschenderweise herausgestellt, dass ein histaminfreies Bier dadurch hergestellt werden kann, dass man bereits vor der alkoholischen Gärung eine thermische Inaktivierung der Keimflora des Malzes und eine thermische Inaktivierung der Keimflora der Maische vornimmt, und dann das in diesem Ausgangsmaterial enthaltene Histidin abbaut, indem man zu der Maische die weiter vorne, im Zusammenhang mit der Milchsäuregärung bereits beschriebene Einzell-Reinkultur des *Lactobacillus delbrückii* zusetzt.

Die Sterilisierung der Maische vor dem Zusatz der Reinkultur des *Lactobacillus delbrückii* wird zweckmässigerweise erreicht, indem man diese während einer Dauer von 30 bis 40 Minuten auf eine Temperatur im Bereich von 62 bis 65 °C erwärmt. Anschliessend wird dann die Maische auf 45 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur mit der Reinkultur des *Lactobacillus delbrückii* beimpft. In der so behandelten Maische findet durch den *Lactobacillus delbrückii* eine kräftige homofermentative Umwandlung von Glucose und Maltose unter Bildung von Milchsäure statt, und gleichzeitig wird das vorhandene Histidin nach primärer Ammoniakabspaltung in Glutaminsäure umgewandelt. Während dieses Schrittes wird das Fortschreiten der Milchsäurebildung und

die parallel hierzu verlaufende Umwandlung des Histidines in Glutaminsäure ständig kontrolliert.

Sobald nach dem Abschluss und der Säuerung der Maische das vorhandene Histidin sehr weitgehend in die l-Glutaminsäure umgewandelt ist, führt man die Hauptgärung, d.h. die alkoholische Gärung des Bieres durch Hefezusatz, d.h. durch Zugabe von *Saccharomyces cerevisiae*, durch. Zweckmässigerweise wird diese alkoholische Gärung durch Beimpfen mit einer Hefe-Reinkultur durchgeführt, welche sowohl den beim Histidinabbau gebildeten Ammoniak als auch die aus dem Histidin gebildete Glutaminsäure und auch die vom *Lactobacillus delbrückii* gebildete Milchsäure teilweise metabolisiert. Es soll also die alkoholische Gärung mit einem solchen Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt werden, der die vorher durch den *Lactobacillus delbrückii* gebildeten Nebenprodukte wieder in optimaler Weise abbaut. In der beschriebenen Weise gelingt es, ein histaminfreies Bier herzustellen. Wenn man dieses Verfahren auf die Herstellung eines alkoholfreien Bieres anwendet, dann kann auch dieses histaminfrei erhalten werden.

Mit grossem Vorteil wird die vorhergehende Umwandlung von Histidin in Ammoniak und Glutaminsäure auch bei der Herstellung anderer alkoholischer Produkte, beispielsweise Wein und Spirituosen, durchgeführt, und man erhält dann ebenfalls histaminfreie alkoholische Produkte oder aus diesen hergestellte Sekundärprodukte, beispielsweise histaminfreien Essig.

Bei der Herstellung von histaminfreiem Wein nach dieser zuletzt erläuterten Ausführungsart des erfundsgemäßen Verfahrens erfolgt, analog wie bei der Bierherstellung, zunächst eine thermische Sterilisierung des Mostes bzw. bei der Rotweinherstellung gegebenenfalls auch der Maische, um unerwünschte Primärkeime abzutöten. Anschliessend wird dann der Most oder die Maische mit einer geringen Menge der Einzell-Reinkultur des *Lactobacillus delbrückii* oder anderer geeigneten Lactobacillen beimpft, und man belässt dann das Material bei der optimalen Gärungstemperatur dieser Mikroorganismen im Bereich von 40–45 °C so lange, bis das im Most bzw. in der Maische enthaltene Histidin zu Ammoniak und Glutaminsäure umgewandelt ist. Auch in diesem Fall bildet der *Lactobacillus delbrückii* oder die anderen zugesetzten *Lactobacillus*-arten gleichzeitig durch die Vergärung von Kohlehydraten Milchsäure. Sobald der gewünschte Histidinabbau stattgefunden hat, erfolgt dann die Durchführung der Hauptgärung, d.h. die Beimpfung mit einer Hefe-Reinkultur, wobei auch in diesem Fall ein *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm verwendet wird, der in optimaler Weise neben der alkoholischen Gärung auch möglichst weitgehend den gebildeten Ammoniak sowie die Glutaminsäure und Milchsäure metabolisiert.

Die oben erwähnte Verfahrensweise kann auch mit Vorteil bei der Herstellung von Spirituosen, also gebrannten alkoholischen Getränken, angewandt werden. Obwohl bei einer sauber durchgeführten Destillation im allgemeinen keine wesentlichen Mengen von Histamin bei der Destillation in das Destillat mitgeführt werden, so hat es sich dennoch herausgestellt, dass im Handel erhältliche Spirituosen, wie Cognac und ähnliches, häufig grosse Histaminmengen enthalten. Auch in diesem Fall kann entweder durch die Auslese eines speziellen Hefestamms oder, im allgemeinen noch vorteilhafter, vor der alkoholischen Gärung durch die Behandlung mit einer Reinkultur des *Lactobacillus delbrückii* oder einer anderen *Lactobacillus delbrückii*-Reinkultur das vorhandene Histidin in unschädliche Nebenprodukte umgewandelt werden.

Gemäss einer weiteren Ausführungsart des erfundsgemäßen Verfahrens kann die Bildung von Histamin bei durch Mikroorganismen hervorgerufenen Umwandlungen auch

dort unterbunden werden, wo normalerweise im Ausgangsmaterial keine wesentlichen Mengen an Histidin enthalten sind, jedoch dann Histidin aus abgestorbenen Zellen des Mikroorganismus entsteht, durch dessen Einwirkung die Umwandlung im Lebensmittel, Futtermittel oder Nahrungsmittel durchgeführt wird.

Ein typisches Verfahren, während dessen Durchführung erst Histidin gebildet wird, ist die Sektherstellung. Bei der Herstellung von Sekt wird bekanntlich einem durch Primär-gärung gewonnenen Wein eine Mischung aus Saccharose und Hefe zugesetzt, und in einem geschlossenen Gefäß, beispielsweise einem Drucktank oder einer geschlossenen Flasche, wird dann die Sekundärgärung vorgenommen. Dabei wird die Saccharose mit Hilfe der Hefe zu Alkohol vergoren, und das dabei entstehende Kohlendioxid bleibt im Rohsekt gelöst. Ein unerwünschter Vorgang, der bei der Sektherstellung abläuft, ist derjenige, dass aus der Hefe stammendes Eiweiss bzw. das aus diesem Eiweiss stammende Histidin dann von den weiterlebenden Hefezellen zu Histamin decarboxyliert wird. Wie aus der weiter vorne angegebenen Tabelle II zu ersehen ist, weist Champagner aufgrund dieses Eiweissabbaues unter Bildung von Histamin einen wesentlich höheren Histamingehalt auf als die für Wein üblichen Durchschnittswerte.

Wenn man das erfundengemäße Verfahren zur Herstellung eines histidinfreien Sektes anwendet, dann wird dem durch Primär-gärung gewonnenen Wein eine Mischung aus einer der weiter vorne beschriebenen Lactobacillen-Reinkulturen, die zu einer Desaminierung des Histidines führen, mit Saccharose und der Hefe zugesetzt. Bei der im Druckbehälter ablaufenden Sekundärgärung wird dann das aus der Hefe stammende Histidin durch den anwesenden Lactobacillus gleich bei seiner Entstehung desaminiert. Dadurch steht den anwesenden lebenden Hefezellen kein Histidin mehr zur Verfügung, das zu schädlichem Histamin decarboxyliert werden kann. Nach dieser Verfahrensweise gelingt es, einen praktisch histidinfreien Sekt herzustellen.

Aus den Mikroorganismen-Reinkulturen, welche zu einer Transaminierung oder Desaminierung des Histidines führen, wurde der für diese Umwandlung verantwortliche Fermentkomplex isoliert. Hierzu wurden die Zellen mechanisch zerstört, die den Fermentkomplex enthaltende Flüssigkeit isoliert und lyophilisiert. Es stellte sich heraus, dass 10^{-3} g des so erhaltenen Fermentmaterials in der Lage sind, 1 g Histidin abzubauen. Der so erhaltene Fermentkomplex wurde in der gleichen Weise, wie dies weiter vorne für die Reinkultur des Lactobacillus delbrückii im einzelnen beschrieben ist, verwendet, um in einem Ausgangsmaterial Histidin zu unschädlichen Produkten abzubauen. Man erhielt dabei analoge Ergebnisse wie bei der Verwendung der Lactobacillus delbrückii-Reinkultur.

Histidin ist an und für sich eine essentielle Aminosäure, d.h. eine Aminosäure, die der Mensch mit der Nahrung aufnehmen muss. Sofern die nach dem erfundengemäßen Verfahren hergestellten Lebensmittel eiweissreich sind, wie zum Beispiel Sauermilchprodukte oder Käse, wird durch die Auswahl eines speziellen Mikroorganismenstammes nicht ein vollständig histidinfreies Lebensmittel erzeugt, sondern es wird lediglich verhindert, dass der Mikroorganismenstamm eine unerwünschte Decarboxylierung von Histidin unter Bildung von Histamin durchführt. Sofern durch den Mikroorganismenstamm Histidin abgebaut wird, wird es, wie bereits früher eingehend erläutert, beispielsweise in unschädliche Glutaminsäure umgewandelt.

Wenn das nach dem erfundengemäßen Verfahren hergestellte Lebensmittel jedoch kein wesentlicher Lieferant von Proteinen ist, wie dies beispielsweise bei alkoholischen Getränken der Fall ist, dann bestehen natürlich überhaupt kei-

ne Bedenken, in diesen Produkten enthaltene geringe Mengen an Histidin vollständig zu entfernen, weil ja die für die Ernährung nötigen Eiweiss-Stoffe ohnehin durch andere Quellen, beispielsweise Fleisch, Eier und Milchprodukte, dem menschlichen Organismus zugeführt werden müssen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nach dem erfundengemäßen Verfahren hergestellte Nahrungsmittel, Genussmittel oder Futtermittel, welche arm an Histamin oder histaminfrei sind.

Die Erfindung sei nun anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung eines histaminarmen oder histaminfreien Bieres

Bei der Durchführung des erfundengemäßen Verfahrens erfolgt die Bierherstellung im wesentlichen nach den bisher üblichen Brauverfahren. Es sei in diesem Zusammenhang beispielsweise auf den Abschnitt betreffend Bierbrauerei im «Lehrbuch der chemischen Technologie» von OST-RASSOW, Ausgabe 1965, Seiten 1394–1405, Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig, verwiesen.

Es werden jetzt die wesentlichen Arbeitsschritte bei der Durchführung eines Brauvorganges erläutert und am

Schluss hervorgehoben, wodurch sich das erfundengemäße Verfahren von dem bisher üblichen Verfahren unterscheidet.

1. Schritt – Malzbereitung:

Der Hauptrohstoff für das Bier, nämlich die Gerste, enthält zunächst keinen vergärbaren Extrakt. Durch das Keimen der Gerste in der Mälzerei werden Enzyme gebildet, die den Korninhalt beim Maischen in lösliche Form überführen. Aus der unlöslichen Stärke wird dadurch löslicher Zucker gebildet, der vergärbar ist. Außerdem werden durch weitere beim Keimen gebildete Enzyme hochmolekulare Stoffe in niedrigmolekulare umgewandelt. Durch das Trocknen des Keimgutes, nämlich das Darren, bilden sich schliesslich für das Bier wichtige Farbstoffe und Aromastoffe.

2. Schritt – Das Brauen:

Bei der Herstellung der «Würze» lässt man die löslichen Anteile des Malzscholates, und zwar etwa 75% des Korninhaltes, durch die Einwirkung der in der Mälzerei gebildeten Enzyme sich in Wasser lösen. Nach der Filtration der Würze von den ungelösten Teilen erfolgt das Kochen der Würze unter Zusatz von Hopfen und die Einstellung der gewünschten Stammwürzprozente, indem man mehr oder weniger Wasser verdampft.

3. Schritt – Die alkoholische Gärung:

Nach dem Abfiltrieren des Hopfens aus der heißen Würze wird diese unter Verwendung von Kühlapparaturen möglichst rasch auf die Gärtemperatur abgekühlt. Die Gärtemperatur liegt bei der Herstellung eines untergärigen Bieres bei 5–7 °C und bei der Herstellung eines obergärigen Bieres bei 14–16 °C. Die Brauereihefe wird zugesetzt und die alkoholische Gärung bei den angegebenen Temperaturen ablaufengelassen, und zwar üblicherweise während 8–10 Tagen. Das so erhaltene Bier wird dann der Nachgärung in den Gärgefäßern unterworfen, schliesslich die Hefe durch Filtern entfernt und das Bier in Flaschen oder Fässer abgefüllt und gelagert.

Dieser konventionelle Brauvorgang wird wie folgt abgeändert, um nach dem erfundengemäßen Verfahren ein histaminarmes oder histaminfreies Bier herzustellen.

Es zeigte sich, dass die Oberfläche der Gerste, die in Malz umgewandelt werden soll, bereits mit vielen Mikroorganis-

men verunreinigt ist. Dies führt dazu, dass bereits während des Maischvorganges in der Anwesenheit des Wassers nicht nur die erwünschte Umwandlung von unlöslicher Stärke in lösliche Zucker abläuft, sondern auch ziemlich grosse Mengen des in den Proteinen der Gerste vorhandenen Histidines durch diese Mikroorganismen zu Histamin decarboxyliert werden. Es zeigte sich ferner, dass die das Histidin zu Histamin abbauenden Mikroorganismen hitzeempfindlich sind.

Bei der Durchführung des Brauvorganges nach dem erfundungsgemässen Verfahren werden daher die an der Oberfläche der Gerste befindlichen unerwünschten Mikroorganismen abgetötet, indem man eine Kurzzeitbehandlung mit siedendem Wasser durchführt, also ein sogenanntes Blanchierverfahren, oder indem man die Gerste in Wasser eintaucht, das eine Temperatur von 75–100 °C aufweist. Das Wasser wird verworfen, und die Gerste wird mehrere Male mit keimfreiem Wasser einer Temperatur von 50 °C nachgewaschen.

Dann wird in gleicher Weise wie beim konventionellen Brauverfahren die gekeimte Gerste gedarrt und ebenfalls wie beim konventionellen Arbeitsverfahren das Malz zerkleinert und mit warmem, jedoch keimfreiem Wasser vermischt und die Würze mit dem Hopfen gekocht.

Nach der Hopfenentfernung muss bei der Durchführung des erfundungsgemässen Verfahrens die Kühlung der Würze unter absolut sterilen Bedingungen durchgeführt werden, indem man keimfreie Kühler verwendet. Dieser Arbeitsschritt ist wesentlich, damit eine erneute Infektion der Würze während des Kühlvorganges mit Mikroorganismen der Umgebung verhindert wird. Anschliessend erfolgt dann die alkoholische Gärung der Würze, indem man eine solche Einzell-Reinkultur an Hefe, nämlich an *Saccharomyces cerevisiae*, zusetzt, die Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut. Diese Reinkultur an *Saccharomyces cerevisiae* war diejenige, die bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen, Grisebachstrasse 8, D-3400 Göttingen, unter der Nummer DSM 70449 hinterlegt ist und dort jederzeit frei bezogen werden kann.

Beispiel 2

Herstellung eines histaminfreien Weines

Die Trauben wurden in üblicher Weise gepresst und der Most entschleimt. Anschliessend wurde jedoch der Most sofort pasteurisiert, indem man ihn einer Hitzebehandlung bei einer Temperatur von 62–68 °C während etwa 30 Min. unterwarf oder indem man einen dünnen Film des Mostes einer nur 1 Minute dauernden Hitzebehandlung bei einer Temperatur von 71–74 °C unterwarf.

Anschliessend wurde der so pasteurisierte Most sofort auf eine Temperatur von 15–20 °C gekühlt und mit einer reinen Einzellkultur von *Lactobacillus delbrückii* beimpft, der Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut. Ein hiefür geeigneter Stamm ist der Stamm mit der Bezeichnung M. Rogosa, der in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Grisebachstrasse 8, D-3400 Göttingen, die Hinterlegungsnummer DSM 20074 besitzt. Dieser Mikroorganismenstamm ist auch bei der Amerikanischen Sammelstelle, American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 – USA, hinterlegt und besitzt dort die Nummer ATCC 9649 und kann bei beiden Hinterlegungsstellen frei bezogen werden.

Die Milchsäuregärung des beimpften Mostes wurde während 24–48 Stunden bei einer Temperatur von 15–20 °C durchgeführt. Während dieser Milchsäuregärung wurde das gesamte im Most anwesende Histidin durch den *Lactobacillus delbrückii* entfernt, und auch ein Anteil der Zuckerbe-

standteile des Mostes wurde von diesem *Lactobacillus delbrückii* unter Bildung von Milchsäure abgebaut.

Anschliessend wurde der Most mit Hefe beimpft und die alkoholische Gärung in der üblichen Weise durchgeführt. 5 Während dieser alkoholischen Gärung wurde ein Teil der durch den *Lactobacillus delbrückii* gebildeten Milchsäure von der Hefe abgebaut, jedoch ein Teil der Milchsäure blieb in dem Wein zurück, und dadurch wurde der Geschmack des erhaltenen Weines verbessert.

10 In diesem Falle war die Hefe, die zur Durchführung der alkoholischen Gärung eingesetzt wurde, keine Einzell-Reinkultur, sondern üblich vorkommende Hefe, die vorhandenes Histidin zu Histamin abbauen würde.

Bei Beendung der alkoholischen Gärung wurde der Wein 15 den üblichen Behandlungen unterworfen, d. h. gekühlt, filtriert und in Flaschen abgefüllt.

Der Wein wurde auf seinen Histamingehalt getestet, und es konnte überhaupt kein Histamin festgestellt werden. Der Geschmack, der Geruch und die Farbe des Weines waren 20 hervorragend gut.

Zu Vergleichszwecken wurde in einem zweiten Ansatz der frische Most in der gleichen Weise pasteurisiert und gekühlt, wie dies oben erläutert wurde, anschliessend erfolgte jedoch keine Beimpfung mit der Einzellkultur des *Lactobacillus delbrückii*, sondern der sterilisierte Most wurde sofort mit der gleichen natürlichen Hefe beimpft wie beim ersten Arbeitsverfahren. Auch die alkoholische Gärung, die Kühlung, das Filtrieren und das Einfüllen in Flaschen wurde in der gleichen Weise durchgeführt wie beim oben beschriebenen Verfahren.

In diesem Falle waren die Farbe und der Geruch des Weines wieder hervorragend gut, der Geschmack jedoch weniger abgerundet und harmonisch als bei dem nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellten Wein. In diesem 35 Falle zeigte der Wein einen Histamingehalt von 2,5 mg/kg, d. h. einen Histamingehalt, der in etwa in der gleichen Größenordnung liegt wie bei üblichen im Handel erhältlichen Weissweinen.

Beispiel 3

Herstellung von histaminfreien sauren Gurken

50 kg frisch geerntete saure Gurken, und zwar der nicht ausgewachsenen kleinen Gurken, wie sie üblicherweise zu diesem Zweck verwendet werden, wurden zur Herstellung 45 von sauren Gurken in einen verschliessbaren Behälter gegeben. In diesem Behälter wurden die Gurken einer Behandlung mit Wasserdampf während $\frac{1}{2}$ bis 1 Minute unterworfen, um alle auf der Oberfläche der Gurken vorhandenen Mikroorganismen abzutöten.

Gesalzenes Wasser wurde gekocht, und man setzte die üblichen Gewürze, beispielsweise geschnittene Zwiebeln, Dill und ähnliches, zu und kochte noch 2 Minuten weiter, um sicherzustellen, dass alle anwesenden Keime abgetötet sind. Dann wurde die wässrige Lösung auf etwa 45 °C abgekühlt 55 und unter Aufrechterhaltung der keimfreien Bedingungen in die Behälter gegossen, in denen sich die Gurken befanden. Man beimpfte dann mit der in Beispiel 2 beschriebenen reinen Einzellkultur von *Lactobacillus delbrückii*, welcher Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut. Bei einer Temperatur von 35–45 °C wurde die Milchsäuregärung während 60 2 Wochen ablaufengelassen.

Anschliessend wurden die sauren Gurken in Behälter gefüllt und diese unter Aufrechterhaltung der sterilen Bedingungen verschlossen.

Bei einer Testung des Produktes auf seinen Histamingehalt konnte kein Histamin festgestellt werden, woraus man sieht, dass der Histamingehalt des Produktes eindeutig unterhalb von 0,1 mg/kg liegt.

Zu Vergleichszwecken wurde ein weiterer Ansatz von frisch geernteten Gurken in der gleichen Weise behandelt, jedoch wurde die Behandlung des Produktes mit dem Wasserdampf nicht durchgeführt, und nach der Zugabe der wässrigen Lösung erfolgte auch keine Beimpfung des Produktes, sondern die Milchsäuregärung wurde mit Hilfe derjenigen natürlich vorkommenden Milchsäurebakterien durchgeführt, die auf den Ausgangsmaterialien vorhanden waren.

Die Milchsäuregärung wurde bei den gleichen Temperaturbedingungen und während der gleichen Zeit durchgeführt wie beim oben beschriebenen Verfahren und das Produkt wieder in Behälter abgefüllt.

In diesem Fall zeigte das Produkt einen Histamingehalt von 9,8 mg/kg.

Beispiel 4

Herstellung eines histaminfreien Sauerkrautes

Frisch geernteter Weisskohl wurde geschnitten, gesalzen, und die üblichen Gewürze, beispielsweise Wacholderbeeren, wurden zugesetzt, und dann behandelte man ihn 1 Minute lang mit Wasserdampf, um alle auf dem Ausgangsmaterial vorhandenen Mikroorganismen abzutöten. Dann liess man das Ausgangsprodukt so lange stehen, bis seine Temperatur auf unter 45 °C gesunken war. Anschliessend beimpfte man mit der Einzellreinkultur an *Lactobacillus delbrückii*, die Hi-

stidin ohne Bildung von Histamin abbaut und die auch gemäss Beispiel 2 verwendet wurde. Die Milchsäuregärung wurde während 2 Stunden bei einer Temperatur im Bereich von 35–45 °C durchgeführt. In dem so erhaltenen Endprodukt konnte kein Histamin festgestellt werden.

Beispiel 5

Herstellung eines histaminfreien Joghurts

Frischmilch wurde pasteurisiert und auf eine Temperatur im Bereich von 35–45 °C gekühlt. Anschliessend beimpfte man mit einer Einzell-Reinkultur eines solchen Stammes an *Lactobacillus yoghourt*, der Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut. Ausserdem beimpfte man das Ausgangsmaterial noch mit einer Einzell-Reinkultur eines solchen Stammes von *Streptococcus thermophilus*, der ebenfalls Histidin ohne Bildung von Histamin abbaut.

Die Milch, die mit den beiden Einzell-Reinkulturen beimpft war, wurde während 12 Stunden bei einer Temperatur von 35–45 °C belassen.

Anschliessend wurde das so hergestellte Joghurt in die Behälter abgefüllt und gekühlt.

Bei der Testung des Endproduktes auf Histamin konnte kein Histamin festgestellt werden, und das Produkt besass einen hervorragend guten Geschmack.