

2. Literaturübersicht

2.1. Enterokokken

2.1.1. Nomenklatur und systematische Einordnung

THIERCELIN (1899) war der erste, der den Terminus „Enterococcus“ zur Beschreibung eines grampositiven Diplococcus nutzte. Er isolierte ihn aus dem Darm eines Rindes, später erfolgte dessen Einordnung in das neue Genus *Enterococcus* als Spezies *Enterococcus proteiformis* (THIERCELIN u. JOUHAUD, 1903). ANDREWS u. HORDER (1906) benannten Thiercelin's *Enterococcus* in *Streptococcus faecalis* um, basierend auf der Fähigkeit kurze oder längere Ketten zu bilden. Die ersten Beschreibungen bezogen sich somit hauptsächlich auf die Morphologie, spätere Untersucher hatten die Kennzeichnung durch biochemische Merkmale zu bestätigen.

Zahlreiche Wissenschaftler bemühten sich seitdem die Stellung der Enterokokken im taxonomischen System zu erforschen. LANCEFIELD (1933) ermöglichte die Zuordnung der Enterokokken zur „serologischen Gruppe D“ (D-Streptokokken), indem sie für diese Mikroorganismen ein gruppenspezifisches Antigen nachwies. Häufig wird in der Literatur nicht zwischen D-Streptokokken und Enterokokken unterschieden. Allein die Spezies mit dem gruppenspezifischen Antigen D in ihrer Zellwand zählen zu den D-Streptokokken: *Ec. faecium*, *Ec. faecalis* spp., *Ec. durans*, *Ec. avium* sowie *Sc. bovis* und *Sc. equinus* (HARTMANN et al., 1966; FACKLAM u. COLLINS, 1989). Einen wesentlichen Beitrag zur Klärung der Streptokokkensystematik leistete SHERMAN (1937). Er beschrieb die Enterokokken als eine von vier Hauptgruppen, in die er die Streptokokken unterschied:

- pyogene Gruppe,
- Viridans-Gruppe,
- Lactis-Gruppe und
- Enterokokkengruppe.

Der Autor ordnete der Enterokokkengruppe vier Arten zu: *Sc. faecalis*, *Sc. liquefaciens*, *Sc. zymogenes* und *Sc. durans*.

Zur Identifizierung nutzte SHERMAN neben fermentativen Leistungen auch andere biochemische Merkmale, er führte die sogenannten SHERMAN-Kriterien ein. Sie beruhen auf Wachstumstemperaturen, der Toleranz gegenüber Wärme, Salzen, Alkali und relativ hohen Konzentrationen von Metylenblau sowie der starken Reduktionsfähigkeit.

Eine Vielzahl von Veröffentlichungen zeigen die Entwicklung der systematischen Stellung der Enterokokkengruppe. Auf einige Übersichtsarbeiten sei hier hingewiesen: LANCEFIELD (1932), SHERMAN (1937), SHERMAN u. WING (1937), DEIBEL et al. (1963), HAHN et al. (1970), GARG u. MITAL (1991) u. DEVRIESE u. POT (1995).

In jüngsten Untersuchungen konnten die Enterokokken durch DNA/DNA und DNA/rRNA-Hybridisierung als eigenständiges Genus bestätigt werden (KILPPER-BÄLZ et al., 1982; SCHLEIFER u. KILPPER-BÄLZ, 1984; COLLINS et al., 1984).

WILLIAMS et al. (1991) unterteilten die Enterokokken nach homologen 16S rRNA Sequenzen in 5 Hauptgruppen:

1. *Ec. faecalis*,
2. *Ec. faecium*-Gruppe (*Ec. faecium*, *Ec. hirae*, *Ec. durans*, *Ec. mundtii*),
3. *Ec. avium*-Gruppe (*Ec. avium*, *Ec. pseudoavium*, *Ec. malodoratus*, *Ec. raffinosus*),
4. *Ec. gallinarum*-Gruppe (*Ec. gallinarum*, *Ec. casseliflavus*, *Ec. flavescens*) und
5. *Ec. cecorum*-Gruppe (*Ec. cecorum*, *Ec. columbae*).

Diese Gruppen unterscheiden sich jeweils auch durch ihr biochemisches Verhalten voneinander (DEVRIESE et al., 1993).

Innerhalb der Gruppen können die einzelnen Spezies durch wenige unterschiedliche biochemische Charakteristika differenziert werden. Schwierigkeiten gibt es bei der Trennung zwischen *Ec. faecium* und *Ec. durans* sowie zwischen *Ec. casseliflavus* und *Ec. gallinarum*. Hier hat man kein phänotypisches Merkmal, das immer eine eindeutige Unterscheidung zulässt.

Aufgrund der Überlappung von verschiedenen taxonomischen Systemen gibt es bei der Einordnung der einzelnen Enterokokkenarten immer noch Widersprüche.

Während in der 7. Auflage von Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (BREED et al., 1957) die Zuordnung der Streptokokken zur Familie der Lactobacillaceae erfolgte, wurden sie in der 8. Auflage (BUCHANAN u. GIBBONS, 1974) in den Teil 14 Gram-positive Kokken eingeordnet:

a) aerob und/oder fakultativ anaerob,

Familie II : Streptococcaceae (fam. nov.),

Genus I : Streptococcus.

In der 9. Auflage von Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994) werden die Enterokokken als eigenständiges Genus der Gruppe 17 Gram-positive Kokken zugeordnet.

Folgende Spezies zählen zum Genus Enterococcus: *Ec. faecalis* spp., *Ec. faecium*, *Ec. avium*, *Ec. casseliflavus*, *Ec. durans*, *Ec. gallinarum*, *Ec. hirae*, *Ec. malodoratus*, *Ec. mundtii*, *Ec. raffinosus*, *Ec. solitarius*, *Ec. pseudoavium*, *Ec. cecorum*, *Ec. dispar*, *Ec. saccharolyticus* und *Ec. seriolicida* (HOLT et al., 1994).

2.1.2. Vorkommen und Bedeutung

2.1.2.1. Vorkommen in natürlicher Umgebung

Der natürliche Ansiedlungsort von Enterokokken ist der Magen-Darm-Trakt von Mensch und Tier. Sie machen den Hauptteil der Streptokokkenflora der menschlichen Faeces aus (KENNER et al., 1960). Damit sind Enterokokken immer in häuslichen Abwässern bzw. in mit Abwässern kontaminiertem Wasser sowie kontaminierter Umwelt nachzuweisen. Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass sie nicht zur natürlichen Mikroflora des Bodens sowie von Tiefen- und Quellgewässern gehören (BARTLEY u. SLANETZ, 1960; MEDREK u. LITSKY, 1960; MUNDT, 1963; BALTEANU et al., 1967).

Zum Vorkommen von Enterokokken auf Pflanzen konnten MUNDT u. JOHNSON (1958) sowie MUNDT (1963) durch mehrere Untersuchungen

feststellen, dass sie sich dort zeitweilig ansiedeln und auch in gewissem Maße vermehren können. Enterokokken werden hauptsächlich durch Insekten, Wind und Regen verbreitet.

2.1.2.2. Vorkommen beim Menschen

Enterokokken bilden den größten Anteil der Streptokokkenflora der menschlichen Faeces (KENNER et al., 1960), wobei *Ec. faecalis* einschließlich seiner Varianten und *Ec. faecium* nach Untersuchungen verschiedener Autoren dominieren (COOPER u. RAMADAN, 1955; MOUTOUSSIS et al., 1958; MOUSSA, 1965). SHATTOCK (1962) vertritt in diesem Zusammenhang die Meinung, dass unterschiedliche Angaben hinsichtlich des Anteils der einzelnen Enterokokkenstämme einerseits geographisch bedingt, jedoch auch dem Einfluss der jeweiligen Ernährung anzurechnen sind.

Auch auf der Haut des Menschen kommen Enterokokken vor. KENDREŠKI (1970) wies als dominierende Spezies unter den Enterokokken *Sc. faecalis* var. *faecalis* an den Händen von Personen nach, die mit der Gewinnung und dem Verkauf von Nahrungsmitteln beschäftigt waren. Die Untersuchung von Melkerhänden und -fingern ergab das gleiche Ergebnis.

2.1.2.3. Vorkommen beim Tier

Wie bereits erwähnt ist nach Meinung zahlreicher Autoren der Verdauungstrakt von Mensch und Tier der natürliche Fundort der Enterokokken. Bei 71 % von 216 untersuchten Säugetierarten wies MUNDT (1963) das Vorkommen von Enterokokken nach. KENNER et al. (1960) wiesen bei Kuh, Schaf, Schwein und Geflügel Enterokokken in der Größenordnung von durchschnittlich 0,16 Millionen, 9,42 Millionen, 8,40 Millionen und 2,10 Millionen je Gramm Kot nach. Die Haut des Tieres, insbesondere von Rind und Schwein, ist neben den Faeces ein Fundort von Enterokokken. Diese Tatsache erklärt sich allein aus den vielen Kontaktmöglichkeiten mit Stall- und Weideboden, Kotresten, Einstreu, Futtermittelrückständen und vielem mehr. MÜNCH et al. (1981) ermittelten auf der Euterhaut der Kuh eine Mikroflora, die u.a. auch eine große Anzahl Enterokokken enthält.

Bei Insekten wurde eine Besiedlung speziell der Flügel, Beine, Körperoberfläche sowie abgelagerten Puppen mit dieser Bakterienart festgestellt (EAVES u. MUNDT, 1960).

2.1.2.4. Vorkommen in vom Tier stammenden Lebensmitteln

Über Ablagerungen in Melkanlagen, über Staub und Kot sowie direkt aus dem Euter können Enterokokken in die **Milch** gelangen. Sie sind teilweise thermoresistent und können demnach die Pasteurisierung der Milch überstehen (KIELWEIN, 1994).

Nach ASPERGER (1978) und MÜNCH (1981) beträgt ihr Anteil am Gesamtkeimgehalt der Rohmilch durchschnittlich 4 %. KIELWEIN (1978) untersuchte die Enterokokkenflora von 213 Rohmilchproben. Dabei dominierte *Sc. faecalis* var. *faecalis* mit 40,0 %, gefolgt von *Sc. faecium* mit 28,0 %, *Sc. faecalis* var. *liquefaciens* mit 12,3 % und *Sc. durans* mit 10,5 %. Aus 20 Proben Anlieferungsmilch isolierte JACOBSON (1963) 29 Stämme *Sc. faecalis* var. *faecalis*, 10 Stämme *Sc. faecium* und 3 Stämme *Sc. faecalis* var. *liquefaciens*. Daraus ist ersichtlich, dass die Spezies *Ec. faecalis* und ihre Varianten den Hauptanteil der Enterokokkenflora in Rohmilch ausmachen. HEESCHEN (1971) untersuchte pasteurisierte Trinkmilch und fand in 35 bzw. 48 % der im Winter bzw. Sommer untersuchten Proben Enterokokken. Er differenzierte 40,2% *Sc. faecalis*, 12,8 % *Sc. durans*, 10,2 % *Sc. faecium* und 37,9 % weitere Streptokokken der serologischen Gruppe D. KIELWEIN (1978) hingegen ermittelte in 46 % von 87 Proben pasteurisierter Milch Enterokokken und klassifizierte 50,2 % als *Sc. durans* und 49,8 % als *Sc. faecium*.

Milcherzeugnisse sind in unterschiedlichem Maße mit Enterokokken kontaminiert. Es gibt viele Veröffentlichungen über das Vorkommen von Enterokokken in Käse. Sie gehören zur normalen Reifungsflora der meisten Käsesorten, besonders der Hart- und Edelpilzkäse. KIELWEIN (1977, 1978 und 1978a) veröffentlichte ausführliche und detaillierte Angaben über das Vorkommen von Enterokokken in Käse. Der Autor untersuchte 115 Käseproben und wies in 91 Proben (79,1 %) Enterokokken nach.

In Tabelle 1 und 2 sind zusammenfassend einige Untersuchungsergebnisse von KIELWEIN dargestellt.

Tab. 1: Nachweis von Enterokokken in Käse (nach KIELWEIN, 1977)
Anzahl koloniebildender Einheiten je g

Käseart	n	n positiv	x_A^{*1}	x_G^{*2}
Hartkäse	30	25 = 83 %	1.126.000	90.000
Feste Schnittkäse	22	13 = 59 %	809.000	11.900
Halbfeste Schittkäse	32	26 = 81 %	276.000	29.000
Weichkäse	26	24 = 92 %	160.000	44.700
Sauermilchkäse	5	3 = 60 %	42.000	22.900

*¹ x_A arithmetischer Mittelwert

*² x_G geometrischer Mittelwert

Tab. 2: Prozentualer Anteil der Enterokokkenspezies in Käse
(nach KIELWEIN, 1977)

Spezies	Hartkäse	feste Schnittkäse	halbfeste Schnittkäse	Weichkäse
Sc. faecalis var. faecalis	19,7	5,2	37,8	39,9
Sc. faecalis var. liquefaciens	0,3	1,4	8,8	10,1
Sc. faecium	14,8	49,3	32,0	4,2
Sc. durans	65,2	44,1	21,4	45,8

KIELWEIN stellte fest, dass die Enterokokkenzahl in den Hartkäsen höhere Werte einnahm als in den Schnittkäsen und Weichkäsen. Er folgerte daraus, dass zwischen der Keimzahl an Enterokokken in Käse und der Reifungsdauer eine Beziehung besteht.

Die Untersuchungen von BRANDL et al. (1985) zeigten ebenfalls einen höheren durchschnittlichen Enterokokkengehalt im Hartkäse gegenüber Schnitt- und Weichkäsen. Die Autoren ermittelten den Enterokokkengehalt in 476 Käseproben. Sie bemerkten, dass der Gehalt innerhalb der gleichen Käsesorte

aber auch bei Produktionen des gleichen Betriebes in einem weiten Bereich schwankte. Differenzen konnten auch hinsichtlich des anteiligen Vorkommens der einzelnen Enterokokkenspezies festgestellt werden. In Edamer- und Geheiratskäse war *Sc. faecium* mit 46,6 % bzw. 42,8 % am stärksten vertreten, wohingegen bei Butterkäse *Sc. faecalis* mit 62,3 % den Hauptanteil bildete. In Taleggio, einer Weißschimmelkäsesorte und in einem Frischkäse machte *Sc. durans* den größten Anteil aus.

Die Untersuchungen von GATTI et al. (1993) an 48 verschiedenen italienischen Käsen zeigten ebenfalls einen höheren Enterokokkengehalt in Hartkäse und halbfestem Käse. Sie fanden Enterokokken in über 96 % der Proben, wobei die Enterokokkenzahl je nach Fertigungsprozeß und Reifungsdauer zwischen 10^1 und 10^6 KbE/g schwankte.

Aufgrund des Vorkommens von Enterokokken im „Rohmaterial“ Milch und der vielfältigen Kontaminationsmöglichkeiten während der Verarbeitung sind sie auch in zahlreichen anderen Milchprodukten, z.B. Buttermilch, Kefir, Sahne, Joghurt, Speiseeis, Butter und Speisequark, regelmäßig zu finden (JACOBSON, 1963; DOBBERTIN u. SIEMS, 1975; KIELWEIN, 1978; OTTE et al., 1979; VANOS, 1991). In fermentierten Milcherzeugnissen werden Enterokokken teilweise als Starterkulturen eingesetzt (VANOS, 1991).

In **Fleisch- und Fleischerzeugnissen** einschließlich **Geflügel** werden Enterokokken ebenfalls regelmäßig angetroffen. Die Kontamination geschieht entweder noch zu Lebzeiten des Tieres durch Darmbakterien, die durch Streß oder Infektion in die Muskelschicht gelangen, während des Schlachtprozesses und/oder während der Verarbeitung zum Produkt durch Gerätschaften sowie Personal.

KLEIN et al. (1998) fanden in 275 Proben Schweine- und Rinderhackfleisch Enterokokkenkonzentrationen von $0,5 \times 10^1$ bis $7,1 \times 10^2$ KbE/g. Die Autoren isolierten 209 Enterokokkenstämme, davon identifizierten sie 87 % *Ec. faecalis*, 4 % *Ec. faecium*, 3 % *Ec. casseliflavus*, jeweils 2 % *Ec. gallinarum* und *Ec.*

durans, 1 % *Ec. hirae* und unter 1 % *Ec. avium*. Die Verteilung der Spezies war im Schweine- und Rinderhackfleisch annähernd gleich.

PRAŠOVSKÁ et al. (1991) untersuchten die mikrobiologische Qualität von mechanisch entbeintem Rindfleisch. Im Vordergrund ihrer Arbeit stand die Isolierung von Indikator-Mikroorganismen: Koliforme und Enterokokken. Die Autoren untersuchten das Fleisch vor und nach der Separation sowie gesalzen nach 24stündiger Lagerung im Kühlraum. Während des mechanischen Separationsprozesses kam es zu einem Anstieg der mikrobiologischen Parameter im Vergleich zum Ausgangsrohstoff um 1-2 exponentielle Stellen. Vor der Separation wurden im Rindfleisch Enterokokkenkonzentrationen zwischen $5,2 \times 10^2$ und $5,0 \times 10^4$ KbE/g gefunden.

TURTURA und LORENZELLI (1994) stellten mikrobiologische Untersuchungen an frischen Hühnerbeinen an. Sie fanden unter den gram-positiven Kokken neben Aerokokken, Streptokokken und *Gemella* zu 80,65 % Enterokokken. Davon nahm *Ec. faecalis* mit 48 % den größten Anteil ein. Es folgten *Ec. faecium* (16 %), *Ec. avium* (7 %) und *Ec. durans* (4 %).

Aufgrund der zahlreichen Kontaminationsmöglichkeiten während des Fertigungsprozesses und ihrer relativ großen Widerstandsfähigkeit werden Enterokokken auch in den verschiedensten Fleisch- und Geflügelprodukten angetroffen. Selbst aus erhitzten, gefrorenen und getrockneten Erzeugnissen kann man sie häufig isolieren (STILES et al., 1978; DEVRIESE et al., 1992; BENNANI et al., 1995).

Auch in Fisch- und Fischerzeugnissen sowie in Eiern und Eipulver (OBIGER, 1972; DEVRIESE et al., 1995) sind Enterokokkenbefunde erhoben worden.

2.1.2.5. Lebensmittelhygienische Bedeutung

Das Vorkommen von Enterokokken im Lebensmittel muß unter verschiedenen Aspekten bewertet werden. Sie können als:

- a) Hygieneindikatoren,
- b) Erreger systemischer Erkrankungen und Lebensmittelvergifter,
- c) technologisch erwünschte Vertreter der Reifungsflora und
- d) technologische Schadkeime auftreten.

a) Die Frage, ob jeder Nachweis von Enterokokken in Lebensmitteln eine Fäkalkontamination voraussetzt und sie damit als Fäkalindikatoren generelle Verwendung finden, muß verneint werden. KIELWEIN (1977) stellte heraus, dass sich Enterokokken auch außerhalb des Intestinaltraktes von Mensch und Tier ansiedeln und keine Beziehung zwischen den prozentualen Anteilen der Enterokokkenarten der Faeces von Mensch und Kuh und denen im milchwirtschaftlichen Bereich besteht. KIELWEIN (1977) und MOSSEL et al. (1978) gehen davon aus, dass der Nachweis von Enterokokken in der Milch und Milchprodukten ein Hinweis auf den hygienischen Zustand der verwendeten milchwirtschaftlichen Gerätschaften ist. Die endgültige Enterokokkenzahl in Milchprodukten ergibt sich letztlich aus:

- der Enterokokkenzahl der Rohmilch,
- dem Grad der Abtötung der Enterokokken bei der Wärmebehandlung,
- der Rekontamination nach der Pasteurisierung und
- der Vermehrung im Produkt selbst.

Im Gegensatz zu KIELWEIN stellten ZICKRICK et al. (1986) Enterokokken als Indikatororganismen für fäkale Verunreinigungen und als typische Vertreter der Keimflora länger gelagerter Lebensmittel dar. Auch die Kontamination von Butter mit Enterokokken (*Ec. faecalis*, *Ec. durans*) sei in jedem Fall unerwünscht und stets Indikator für ungenügende Produktionshygiene (ZICKRICK, 1986).

Aufgrund ihrer größeren Widerstandsfähigkeit, v.a. gegenüber den typischen Indikatorkeimen, den coliformen Keimen, könnten Enterokokken nach Meinung einiger Autoren auch bei Frischfleisch, Wurst, Halbkonserven, gefrorenen und

getrockneten Fleischerzeugnissen als Hygieneindikatoren dienen (LEVETZOW, 1972; ZICKRICK et al., 1986; TURTURA u. LORENZELLI, 1994).

b) In den letzten Jahren wurden die Enterokokken als Krankheitserreger immer bedeutender. Sie spielen bei Urogenitalinfektionen, bakteriellen Endocarditiden, Meningitiden, Pneumonien, Wundinfektionen, Osteomyelitis sowie Enteritiden und Bakteriämien eine Rolle (ROSENTHAL, 1986; CANTONI u. BERSANI, 1988; SCHABERG et al., 1991; LEMMEN u. DASCHNER, 1996). Das durch Enterokokken produzierte α -Hämolyisin scheint toxisch für menschliches und tierisches Gewebe zu sein. BATISH et al. (1984) fanden eine enge Beziehung zwischen der Produktion von α -Hämolyisin, der Letalität und der nekrotischen Prozessen bei Hasen, verursacht durch *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* Stämme. Bei β -hämolisierenden Enterokokken konnten diese Effekte nicht festgestellt werden. Es wird diskutiert, ob die Produktion von α -Hämolyisin und Thermonuclease die Hauptfaktoren für die Pathogenität von Enterokokkenstämmen sind.

Durch die Entwicklung der Diagnostik sind die Fälle von Erkrankungen, die ursprünglich durch Enterokokken direkt aus dem Lebensmittel verursacht werden, zurückgegangen. Tatsächlich wird die Rolle der Enterokokken in Lebensmitteln als Krankheitsverursacher in der Literatur diskutiert und in Frage gestellt. DEIBEL und SILLIKER (1963) sowie SEDOVA (1970) bezweifeln die Rolle der Enterokokken in diesem Punkt, sie konnten bei freiwilligen Versuchspersonen keine Vergiftungserscheinungen auslösen. Unterdessen gelang es MOORE (1955) sowie CANTONI und BERSANI (1988) durch die Gabe von enterokokkenhaltigen Lebensmitteln gastrointestinale Erscheinungen hervorzurufen.

Unbestritten ist die Fähigkeit der Enterokokken, Aminosäuren zu biogenen Aminen zu decarboxylieren. Biogene Amine sind in der Lage, bei empfindlichen Personen oder Personen mit Monoaminoxidasen (MAO)-Blockaden Gesundheitsstörungen auszulösen (siehe Kap. 2.2.). Am meisten beschrieben ist die Decarboxylierung von Tyrosin zu Tyramin und Histidin zu Histamin. Besonders die Spezies *Ec. faecalis*, *Ec. faecium* und *Ec. durans* werden in diesem

Zusammenhang genannt (BLACKWELL u. MABBITT, 1965; SCHNÜLL, 1983; BUSCH u. NÖTZOLD, 1988). Neuere Untersuchungen beschäftigten sich u.a. mit der Bildung von Spermin, Spermidin, Putrescin, Cadaverin, Tryptamin und Phenylethylamin in Lebensmitteln. Dabei wurde vorwiegend das Bildungsvermögen durch Enterobacteriaceae, Lactobacillen, Micrococcen, Pediococcen, Lactococcen und Leuconostoc-Stämme untersucht (BRINK et al., 1990; STRAUB et al., 1995; HERNANDEZ-JOVER et al., 1997; ORDÓÑEZ et al., 1997 GONZÁLEZ et al., 1998).

Die Literaturquellen zum Vorkommen von Tyramin bei *Ec. faecalis* sind zahlreich. Der Erstrnachweis gelang GALE (1940). Übersichten zum Schrifttum finden sich u.a. bei BEUTLING (1996) und ASKAR u. TREPTOW (1986). Diese Nachweise beziehen sich größtenteils auf qualitative Untersuchungen. Quantitative Untersuchungen mit empfindlichen Nachweisverfahren unter Prüfung von Einflussfaktoren aus Lebensmitteln sind dagegen seltener zu finden. Ebenso selten wurden weitere Enterokokkenspezies zur Tyraminbildung geprüft.

Die Bildung von Phenylethylamin durch Mikroben wurde erstmals von JOOSTEN u. NORTHOLT (1987) am Beispiel der Enterokokken beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt war sie nur in Pflanzen und Früchten bekannt.

BEUTLING (1992) untersuchte die Histamin- und Tyraminbildung sowie das Aminabbauvermögen von zwei *Ec. faecalis*-Stämmen. Bereits nach zwei Kultivierungsstunden bei 30 °C war ein Anstieg der Tyraminbildung deutlich zu erkennen. Ein *Ec. faecalis* Stamm bildete nach 24 h Bebrütung über 400 µg/ml Tyramin (Keimzahl 24 h > 1 x 10⁸ Keime/ml). THAM (1988) überprüfte die Histaminbildung von 130 *Sc. faecium* und 106 *Sc. faecalis* Stämmen isoliert aus Ziegenkäse. Das biogene Amin wurde von 41 (31,5 %) der *Sc. faecium* und von 2 (1,9 %) der *Sc. faecalis* Stämmen produziert. JOOSTEN und STADHOUDERS (1987) sowie THAM et al. (1990) untersuchten den Gehalt an biogenen Aminen in Käse, welcher mit bestimmten Starterkulturen, in denen Enterokokken enthalten waren, versetzt wurde.

GIRAFFA et al. (1995) untersuchten einen *Ec. faecalis* und drei *Ec. faecium* Stämme auf ihr Vermögen biogene Amine zu bilden. Dabei führten sie zwei

Testreihen durch. Zum einen wurde die Bildung biogener Amine durch die Mikroben nach 24 und 72 Stunden Bebrütung bei 37 °C ohne Zusatz von Vorläuferaminosäuren getestet, zum anderen wurden mit gleichem Versuchsverlauf 0,2 g/l Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan und Lysin hinzugefügt. Bei dem untersuchten *Ec. faecalis* Stamm konnten sowohl mit, als auch ohne Zusatz von Phenylalanin und Tyrosin die beiden biogenen Amine Phenylethylamin und Tyramin nach 24 sowie 72 Stunden Bebrütung analysiert werden. Von den untersuchten *Ec. faecium* Stämmen konnte nur ein Stamm Phenylethylamin bilden. Es wurde mit und ohne Zusatz der Vorläuferaminosäure jeweils nach 72 Stunden Bebrütung gefunden. Dieser Stamm war in der Lage nach Zusatz von Tyrosin nach 72 Stunden Bebrütung ebenfalls Tyramin zu bilden. Von den anderen beiden *Ec. faecium* Stämmen war nur einer in der Lage ohne Zusatz von Tyrosin nach 72 Stunden Bebrütung bei 37 °C Tyramin zu bilden. Nach Zugabe der entsprechenden Vorläuferaminosäure wurde bei beiden *Ec. faecium* Stämmen nach 24 und 72 Stunden Bebrütung Tyraminbildung nachgewiesen. Histaminbildung wurde bei allen untersuchten Stämmen in keiner Versuchsreihe nachgewiesen.

GARDINI et al. (2001) untersuchten den Einfluss von pH, Temperatur, NaCl-Konzentration und Proteolyse auf die Bildung biogener Amine bei einem *Ec. faecalis* Stamm. Phenylethylamin stellte hier gefolgt von Tyramin das wichtigste biogene Amin dar. Seine Konzentration war in 14 von 17 Untersuchungsreihen am höchsten. Am meisten Phenylethylamin wurde bei einem pH-Wert von 6,6, Temperaturen von 23 °C und 37 °C sowie einer Kochsalzkonzentration von 3 % gebildet. Unter diesen Bedingungen konnte auch die meiste Tyraminbildung nachgewiesen werden.

Das Aminbildungsvermögen von 11 *Ec. faecalis* und 5 *Ec. faecium* Stämmen wurde von BOVER-CID et al. (2000) untersucht. Dabei bebrüteten sie die Stämme bei 30 °C und gaben entsprechende Vorläuferaminosäuren hinzu. Alle untersuchten Enterokokkenstämme waren in der Lage Phenylethylamin und Tyramin zu bilden. Bei *Ec. faecalis* wiesen die Autoren Phenylethylaminmengen von 80-585 µg/ml und Tyraminmengen von 419-3763 µg/ml nach. Die *Ec. faecium* Stämme konnten 40-432 µg/ml Phenylethylamin und 474-4337 µg/ml

Tyramin bilden. Andere biogene Amine konnten BOVER-CID et al. (2000) in ihren Untersuchungen nicht nachweisen.

BOVER-CID und HOLZAPFEL (1999) untersuchten 26 Enterokokkenstämme (15 *Ec. faecalis*, 10 *Ec. faecium*, 1 *Ec. durans*) auf ihr Vermögen Tyramin zu bilden. Die Fähigkeit Phenylethylamin bilden zu können wurde nicht geprüft. Bei allen untersuchten Stämmen wurde Tyraminbildung nachgewiesen. Einige Stämme waren in der Lage 4-5 mg/ml Tyramin zu bilden.

SUZZI et al. (2000) untersuchten u.a. das Aminbildungsvermögen von 117 Enterokokkenstämmen, isoliert aus italienischem Ziegenkäse. Auch hier wurde die Fähigkeit zur Phenylethylaminbildung nicht geprüft. Alle untersuchten *Ec. faecalis* Stämme (79), *Ec. faecium* Stämme (16) und *Ec. hirae* Stämme (2) waren in der Lage Tyramin zu bilden. Bei den untersuchten *Ec. durans* (6) und *Ec. gallinarum* (1) Stämmen konnte diese Eigenschaft nicht nachgewiesen werden.

c) Enterokokken gehören zur normalen Reifungsflora der meisten Käse, besonders Hart- und Blauschimmelkäse. *Ec. faecalis* subsp. *faecalis* wird ein qualitätsfördernder Einfluss auf die Reifung von Cheddar-, Emmentaler- und Greyerzerkäse zugesprochen (KIELWEIN, 1994). Durch proteolytische Aktivität entstehen geschmacksverbessernde Stoffe. Schon DAHLBERG u. KOSIKOWSKI (1948) erkannten die Wirkung von *Sc. faecalis* als Starterkultur in Amerikanischem Cheddar-Käse. Sie fanden heraus, dass die Mischung von herkömmlichen Milchsäurebakterien mit *Sc. faecalis* Stämmen dem Käse eine optimale Qualität verlieh.

Ec. faecalis und *Ec. faecium* finden als Starterkulturen auch in anderen Käsesorten, z.B. halbfestem italienischen Käse, Pategras und anderem argentinischem Käse, spanischem Manchego und griechischem Käse sowie Roquefort, Provolone, Mozzarella und Fontina Verwendung (THOMPSON u. MARTH, 1986; PARENTE et al., 1989; FERNANDO et al., 1991; TSAKALIDOU et al., 1993; SCARINCI et al., 1994). Durch die Lipaseaktivität der Enterokokken verursachte Aromastoffe (freie Fettsäuren, Carbonylverbindungen) sind für die Rohwurst- und Schinkenproduktion von Bedeutung (ZICKRICK et al., 1986).

d) Enterokokken können auch ungewollt in Lebensmitteln als technologische Schadkeime auftreten. *Ec. faecalis* var. *liquefaciens* ist in Käse unerwünscht, da er durch seine Proteolyse einen unangenehm bitteren Geschmack auslöst (MAIR-WALDBURG u. STURM, 1958). *Ec. durans* und einzelne Stämme von *Ec. faecium* können an der Übersäuerung und Nachgärung von Käse mit längerer Reifungszeit beteiligt sein. Dies betrifft v.a. Emmentaler, Appenzeller und Jarlsbergkäse (KIELWEIN, 1977). Auch erwünscht vorkommende Enterokokkenstämme können in z.B. Rohwürsten unter bestimmten Bedingungen unerwünschte Veränderungen am Produkt hervorrufen (ZICKRICK et al., 1986).

2.1.3. Charakterisierung und Differenzierung von Enterokokken

Das Genus *Enterococcus* wird in der 9. Auflage von Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994) wie folgt charakterisiert:

„ Die Zellen sind sphärisch oder ovoid, 0,6-0,2 x 0,6-0,25 µm groß, in flüssigen Medien treten sie als Paare oder in kurzen Ketten auf. Endosporen werden nicht gebildet. Gram-positiv. Gelegentliches Vorkommen von Beweglichkeit durch wenig ausgebildete Geißeln. Offensichtlich fehlt eine Kapsel. Fakultativ anaerob, chemoorganotroph mit fermentativem Stoffwechsel; eine große Anzahl von Zuckern werden fermentiert, dabei entsteht hauptsächlich L(+)-Milchsäure aber kein Gas und ein pH-Wert von 4,2-4,6. Der Ernährungsbedarf ist vielseitig. Katalase negativ. Gewöhnlich Wachstum bei 10 °C bis 45 °C (Optimum 37 °C), bei einem pH von 9,6 sowie bei einem Zusatz von 6,5 % NaCl und 40 % Galle. Selten Nitratreduktion. Meist Lactosefermentation. Gewöhnlich Zuordnung zur Lancefield-Gruppe D.“

Enterokokken besitzen die Fähigkeit Äsculin in Glucose und Äsculetin zu spalten. Eigenschaften wie Wachstum bei 0,04 % Kaliumtellurit und 0,01 % Tetrazolium, Wachstum in 0,1 % Methylenblau, Produktion von gelbem Pigment, Arginin- und Hippurathydrolyse, Reduktion von M- α -DG, Wachstum bei 50 °C, Hämolyse und Fermentation von verschiedenen Zuckern sind

speziesspezifisch und werden zur Differenzierung herangezogen (HOLT et al., 1994; DEVRIESE et al., 1996).

In Tab. 3 sind die entsprechenden Eigenschaften, die der Speziesdifferenzierung dienen, aufgeführt.

Es wurde die Hämolysedefinition von HAHN et al. (1970) verwendet. Demnach erfolgte die Beurteilung der Hämolysinbildung wie folgt:

- γ -Hämolyse: keine Veränderungen, indifferentes Wachstum,
- β -Hämolyse: totale Hämolyse,
- α -Hämolyse: partielle Hämolyse, aufgehellte Zone um die Kolonie.

Zusätzlich wurde das Kriterium der Vergrünung, das Auftreten eines Grünschimmels über der α -Hämolyse zur Beurteilung herangezogen.

Tab. 3: Differenzierungsschema für Enterokokken

(nach Hahn et al., 1970; Nusser, 1991)

Enterokokken-species	faecalis	faecium	hirae	durans	gallinarum	casseli-flavus
Koloniefarbe auf CATC* ¹	rot/ rotviolett	farblos/ rosa	rosarot	rosa	rosarot	rotviolett
Hämolyse	β, γ	α	α, β	α, β	α, β	nd
Serologische Gruppe D	91 %	68 %	63 %	75 %	100 %	100 %
Kaliumtellurit	+	-	-	-	-	-
Wachstum bei 50 °C	-	+	-	-	-	-
M- α -DG* ²	-	-	-	-	+	+
Sorbit	+	-	-	-	+ / -	+
Arabinose	-	+	-	-	+ / -	+
Pigment-bildung	-	-	-	-	-	+

Erläuterungen:

- *1 CATC (Citrat-Azid-Tween-Carbonat)
- *2 M- α -DG (Methyl- α -D-Glucopyranosid)
- nd nicht determiniert
- + positiv
- negativ

2.2. Biogene Amine

2.2.1. Allgemeines über biogene Amine

Biogene Amine sind niedermolekulare organische Basen mit Struktur von aliphatischen, aromatischen bzw. heterozyklischen Verbindungen. Sie werden im normalen Stoffwechsel von Mensch, Tier, Pflanze und Mikroorganismen gebildet und metabolisiert (ASKAR u. TREPTOW, 1986). Je nach Anzahl der Aminogruppen im Molekül werden die biogenen Amine in Mono- und Polyamine unterteilt. Sie sind physiologisch hochaktive Substanzen und damit vielseitig am Stoffwechsel lebender Zellen, an Steuerungsvorgängen in höheren Organismen und an metabolischen Reaktionsketten beteiligt (GUGGENHEIM, 1951).

Zu den physiologisch und ernährungshygienisch bedeutenden biogenen Aminen gehören:

- MONOAMINE: Tyramin, Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin,
β-Phenylethylamin;
- POLYAMINE: Tryptamin, Serotonin, Cadaverin, Putrescin, Spermidin,
Histamin.

Die meisten biogenen Amine werden durch Decarboxylierung von Aminosäuren gebildet. Daneben besteht die Möglichkeit der Bildung durch Aminierung von Aldehyden und Ketonen sowie durch Abbau stickstoffhaltiger Verbindungen (GUGGENHEIM, 1951; BAST, 1971). Die zur Decarboxylierung erforderlichen Enzyme, die Decarboxylasen, sind substratspezifisch. Sie benötigen in der Regel ein Coenzym, welches meist eine Vitaminvorstufe darstellt.

So ist Pyridoxal-5-phosphat, eine Vitamin-B6-Vorstufe, notwendig für die Funktion aller α-Aminosäuren-Decarboxylasen, speziell der Tyrosin- und Phenylalanindecarboxylase. Bakterielle Decarboxylasen entfalten ihr Wirkungsoptimum meist im sauren pH-Bereich zwischen 5 und 7 sowie bei Anwesenheit von Kochsalz. Die Decarboxylierung läuft bei 26-37 °C zügig ab (BEUTLING, 1996).

Der Abbau biogener Amine erfolgt am häufigsten durch Oxidation. Zu den Aminoxidasen gehören die Monoaminoxidasen (MAO), die fast alle biogenen Amine oxydieren können (HAGEN u. WEINER, 1959).

Der Aminbildung in Lebensmitteln wurde in den letzten 30 Jahren zunehmend Beachtung geschenkt. Vor allem Lebensmittel, die durch ihren Herstellungsprozeß (Fermentation, Reifung, Lagerung) mikrobiellen Veränderungen ausgesetzt sind, können erhöhte Amingehalte aufweisen (RAMANTANIS et al., 1985). Sie sind damit lebensmittelhygienisch besonders relevant.

Die Entstehung biogener Amine durch Bakteriendecarboxylasen wird durch folgende Faktoren beeinflusst (SUHREN et al., 1982):

- Vorhandensein freier Aminosäuren,
- Vorkommen von Mikroorganismen mit entsprechender Decarboxylaseaktivität,
- günstige Wachstumsbedingungen für die Mikroben und die Bildung von Decarboxylasen.

Somit laufen entweder unerwünschte mikrobiologische Veränderungen ab oder die Lebensmittel entstehen durch beabsichtigte biologische Prozesse, wobei die biogenen Amine als Nebenprodukte entstehen können. Solche Lebensmittelgruppen sind v.a. Fisch, Käse, Fleisch und Fleischprodukte aber auch Wein, Sauerkraut und in geringem Maße Bier. Frische Rohprodukte ohne mikrobielle Einwirkung sowie hygienisch einwandfreie Lebensmittel enthalten, mit Ausnahme von Früchten, nur geringe Mengen an biogenen Aminen (TREPTOW u. ASKAR, 1987). Daraus ergibt sich ihre Bedeutung als Qualitätsindikatoren für Lebensmittel. Es gibt viele Untersuchungen zum Gehalt an biogenen Aminen in Lebensmitteln. U.a. wurden Schafskäse (ORDÓÑEZ et al., 1997), Rohwürste (PECHANEK et al., 1983; RAMANTANIS et al., 1985; SCHEUER u. RÖDEL, 1995), Schweinefleisch, Hackfleisch, Bratwürste (SLEMR, 1981; WORTBERG u. WOLLER, 1982) sowie Fisch, Wein und Milchprodukte (PECHANEK et al., 1980, 1980a und 1983; SUHREN et al., 1982) auf ihren Amingehalt geprüft.

Biogene Amine zeichnen sich durch hohe Hitzebeständigkeit und pH-Stabilität aus. Sie überstehen Erhitzungen auf über 100 °C und bleiben zwischen pH 5 und 11 chemisch stabil sowie physiologisch wirksam. Sie reagieren basisch (BEUTLING, 1996).

Die Bedeutung der biogenen Amine ist vielseitig. So sind sie Aroma- und Geschmacksstoffe, wirken mit bei der nichtenzymatischen Bräunung, sind Vorläufer oder -bestandteile von Alkaloiden und können ergänzend zur Qualitätskontrolle von Lebensmitteln genutzt werden. Weiterhin spielen sie eine Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie sowie als Stabilisatoren von Nucleinsäuren in Pflanzen. Schließlich sind sie bei der Auslösung von Migräne und Lebensmittelvergiftungen von Bedeutung (ASKAR, 1982).

Bei parenteraler Applikation besitzen biogene Amine eine hohe Toxizität. Nach oraler Aufnahme sind sie für den gesunden Warmblüterorganismus nur gering toxisch, da hier ausreichend Aminoxidasen zu deren Entgiftung bereitstehen. Die Enzyme werden v.a. im Darm, aber auch in anderen Organen wie Leber, Lunge und Niere gebildet. Die körpereigenen Entgiftungsmechanismen reichen unter bestimmten Bedingungen nicht aus (SUHREN et al., 1982):

- hohe Aufnahmemengen,
- genetische Enzymdefekte,
- Einnahme von Aminoxidase-Blockern,
- Aufnahme von Alkohol oder anderen Drogen;

dann kommt es zu typischen Vergiftungserscheinungen, wie Blutdruckanstieg, Pulsabfall, pochender Kopfschmerz und manchmal regelrechten Schocksyndromen. Besondere Bedeutung bekommen in diesem Zusammenhang Medikamente, die als MAO-Hemmer wirken. Diese Eigenschaft besitzen z.B. Psychopharmaka, Tuberkulostatika, Antibiotika und Coronardilatatoren (SINELL, 1978). Bei Personen, die diese Medikamente einnehmen, reichen oftmals schon geringe Aminmengen in Lebensmitteln aus, um Vergiftungserscheinungen hervorzurufen.

Weitere Informationen über biogene Amine und ihre lebensmittelhygienische Bedeutung findet man in MAGA (1978), PECHANNEK et al. (1980), ASKAR

(1982), JANZ et al. (1983), ASKAR u. TREPTOW (1986), BEUTLING (1996, 1996a).

2.2.2. Vorkommen und Bedeutung von Phenylethylamin als Begleitamin des Tyramins

In einem Lebensmittel können sehr variable Mengen an einem Amin und mehreren Aminen gleichzeitig vorliegen. Sogenannte Begleitamine verlängern und verstärken die Wirkung von toxikologisch bedenklichen Aminen. Wie z.B. Putrescin und Cadaverin die Histaminwirkung beeinflussen, verstärkt das zumeist gemeinsame Vorkommen von Tyramin und Phenylethylamin deren eigene Wirkung.

Biogene Amine in Lebensmitteln entstehen meist durch mikrobielle Enzyme, entweder im Zuge von beginnendem Verderb oder während einer enzymatischen Verarbeitungsstufe. Wie schon erwähnt sind das v.a. Produkte wie Käse, Rohwurst, Sauerkraut, Salz- und Matjesheringe, aber auch Bier, Wein und Schokolade. Bei deren Herstellung spielen zumeist Starterkulturen eine wichtige Rolle (BEUTLING, 1996). Zu den Phenylethylamin- und Tyraminbildnern gehören nach STRAUB et al. (1995) u.a. Enterokokken, Laktobazillen, Pediokokken und andere Keimgruppen. Mehrere Autoren beschrieben die Bildung biogener Amine durch Mikroorganismen, die als Starterkulturen eingesetzt werden. So untersuchten z.B. STRAUB et al. (1995) Carnobakterien, Laktobazillen und Mikrokokken; HERNÁNDEZ-JOVER et al. (1997) Pediokokken und Laktobazillen; ORDÓÑEZ et al. (1997) Laktokokken sowie ROIG-SAGUÉS und EEROLA (1997) verschiedene Gemische von Starterkulturen mit Laktobazillen, Enterobakterien, Enterokokken, Staphylokokken und aeroben mesophilen Bakterien auf deren Aminbildungsvermögen. GONZÁLES DE LLANO et al. (1998) testeten Laktokokken und Leuconostocstämme auf ihr Vermögen Tryptamin und Tyramin zu bilden. Da die auftretenden Tyraminmengen Vergiftungserscheinungen hervorrufen könnten, forderten die Autoren, wie schon einige vor ihnen, Starterkulturen vor dem Einsatz auf ihr

Aminbildungsvermögen zu untersuchen und auf minimale Aminproduktion zu selektieren.

JOOSTEN und NORTHOLT (1987) untersuchten den Einfluss von *Ec. faecalis* und *Ec. durans* auf das Aminbildungsvermögen in holländischem Käse. Nur bei *Ec. faecalis* konnte bei einem Gehalt von $2,0 \times 10^9$ cfu/g Phenylethylamin nachgewiesen werden. Nach einer Reifungszeit von 180 Tagen wurde die maximale Konzentration von 12,80 mmol/kg gefunden. Tyramin wurde bei *Ec. faecalis* in Konzentrationen von 10^6 cfu/g und bei *Ec. durans* Konzentrationen von 10^7 cfu/g detektiert. JOOSTEN (1987) untersuchte verschiedene Einflussfaktoren auf die Bildung von biogenen Aminen in Käse. Phenylethylamin fand sich nur in Käse mit hohen Konzentrationen an Tyramin. Nach Meinung des Autors scheint es keine spezifische Decarboxylase für Phenylalanin zu geben. Die Tyrosindecarboxylase ist danach für die Bildung von Phenylethylamin verantwortlich. Erwähnenswerte Konzentrationen dieses Amins (12,8 mmol/kg) wurden in Käse gefunden, der mit einer hohen Anzahl von *Ec. faecalis* Keimen beimpft wurde. Da Phenylalanin in reifendem Käse in hohen Konzentrationen auftrat, stellte dies keinen limitierenden Faktor für die Bildung von Phenylethylamin dar.

SCHNELLER et al. (1997) untersuchten die Aminkonzentration in halbfestem Käse, welcher aus pasteurisierter Milch, Rohmilch und mit verschiedenen Starterkulturen hergestellt wurde. In diesen Studien stieg die Aminkonzentration zwischen dem 2. und dem 3. Monat der Reifung signifikant an. Ein hoher Gehalt an Enterokokken und Enterobacteriaceae bedingte die Aminkonzentration. Laktobazillen schienen nicht von Bedeutung. Aus den Untersuchungen ging eindeutig hervor, dass Käse hergestellt aus pasteurisierter Milch einen geringeren Gehalt an Phenylethylamin ($\bar{x}=9,4$ mg/kg, $n=10$) und Tyramin (131,9 mg/kg, $n=10$) aufwies als Käse aus Rohmilch (PEA: $\bar{x}=24,6$ mg/kg; TYR: $\bar{x}=294,9$ mg/kg, $n=9$).

In Tab. 4 sind Literaturangaben zum Vorkommen beider Amine in Käse zusammengefasst.

Tab. 4: Literaturübersicht zum Gehalt an Phenylethylamin (PEA) und Tyramin (TYR) in verschiedenen Käsesorten in mg/kg

Käse	n	PEA \bar{x}	TYR \bar{x}	Literatur
Cheddar	22	21	118	Koehler u. Eitenmiller (1978)
	33	0	11	Laleye et al. (1987)
Swiss	5	16	84	Koehler u. Eitenmiller (1978)
Österr.				Pechanek et al.
Emmentaler	12	59	290	(1983)
Emmentaler	22	42	265	Antila et al. (1984)
Holländischer Käse	8	9	138	ten Brink et al. (1990)
Stangenkäse	3	85,4	279	Pechanek et al. (1983)
Weichkäse	19	0,05	1,5	Schneller et al. (1997)
Halbfester Käse	24	12,3	141,0	Schneller et al. (1997)
Hartkäse	6	1,5	47,2	Schneller et al. (1997)

TEN BRINK et al. (1990) untersuchten den Gehalt an biogenen Aminen in verschiedenen holländischen fermentierten Produkten. Unter anderem fanden sie heraus, dass unter hygienisch einwandfreier Produktion hergestellter Gouda und Maasdamer kaum nennenswerte Gehalte an Aminen aufwiesen, dagegen waren in Proben, die in kleinen Manufakturen hergestellt wurden, höhere Konzentrationen zu finden. Die Autoren stellten den Einfluss der hygienischen Komponente auf den Gehalt an biogenen Aminen heraus.

In der Veröffentlichung von SCHNELLER et al. (1997) beschrieben die Autoren ebenfalls den Amingehalt in rohem Rind- und Hühnerfleisch sowie in verschiedenen Rohwürsten. Während die untersuchten Proben von rohem Fleisch aminarm waren, konnte in den Rohwürsten generell ein hoher Gehalt von fast allen untersuchten Aminen festgestellt werden.

Tab. 5: Literaturübersicht zum Gehalt an Phenylethylamin (PEA) und Tyramin (TYR) in Fleisch und Fleischprodukten in mg/kg

Probenart	n	PEA \bar{x}	TYR \bar{x}	Literatur
Rindfleisch roh	1	<0,1	23,5	Pechanek et al. (1983)
Hühnerfleisch roh	1	<0,1	22,8	Pechanek et al. (1983)
Salami	13	28	226	Pechanek et al. (1983)
Salami	24	9,4	368,2	Vandekerckhove (1977)
Westf. Schinken	6	50,9	254	Pechanek et al. (1983)
franz. luftgetrocknete				
Wurst (Schwein)	3	5,7	564,2	Vandekerckhove (1977)
ägyptische Wurst	50	9,70	14,25	Shalaby (1993)

In frischem Schlachtfleisch kommen biogene Amine praktisch nicht vor. Sie entstehen in zunehmendem Maße bei der Lagerung infolge bakterieller Reifungs- und Verderbnisvorgänge der Eiweißbestandteile (WORTBERG u. WOLLER, 1982). KOEHLER und EITENMILLER (1978) untersuchten Rohwürste u.a. auf ihren Gehalt an Tyramin und Phenylethylamin. Nach deren Ergebnissen enthielten 85 % der Rohwürste Tyramin in einer durchschnittlichen Menge von 133 mg/kg. Phenylethylamin kam unter 3 mg/kg und nur in 38 % der Proben vor.

Einige Angaben zur Konzentration von Phenylethylamin und Tyramin in Fleisch und Fleischprodukten sind in Tabelle 5 dargestellt.

In neuesten Untersuchungen des Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Sachsen-Anhalt wurden verschiedene Lebensmittelproben auf ihren Gehalt an biogenen Aminen untersucht. Die Ergebnisse für Phenylethylamin und Tyramin sind Tab. in 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Vorkommen von Phenylethylamin und Tyramin in verschiedenen Lebensmittelproben (CHANÉ, GIFFEY; 2000)

Probenart		< 50 mg/kg	< 200 mg/kg	> 200 mg/kg
Fisch- u.	PEA	98,5 %	1,5 %	0,0 %
Fischerzeugnisse (n=134)	TYR	94,8 %	3,7 %	1,5 %
Rohmilchkäse (n=27)	PEA	88,9 %	11,1 %	0,0 %
	TYR	74,1 %	14,8 %	11,1 %
Sauerkraut (n=36)	PEA	100,0 %	0,0 %	0,0 %
	TYR	41,7 %	58,3 %	0,0 %

In den angeführten Untersuchungen steht jedesmal eine höhere Konzentration von Tyramin einer niedrigeren Phenylethylaminkonzentration gegenüber.

Den Amingehalt als Aussage der Qualität eines Lebensmittels beschrieben u.a. ROGOWSKI und DÖHLA (1984) mit ihren Untersuchungen an frischem, gereiftem und verdorbenem Fleisch. In den verdorbenen Fleischproben stiegen die Konzentrationen von Phenylethylamin und Tyramin neben anderen Aminen bedeutend an. Stark verdorbene Proben wiesen durchweg Amingehalte auf, die zu Lebensmittelvergiftungen hätten führen können.

Der Gehalt an Phenylethylamin und Tyramin hängt wesentlich von der Art und der Herkunft des Lebensmittels sowie vom Vorkommen entsprechender Mikroorganismen ab.

Viele andere Produkte, wie z.B. Fisch, Wein, Bier, Früchte und Schokolade, bei denen genannte Amine eine Rolle spielen, sind auf deren Gehalt untersucht worden. Weitere Angaben zu deren Vorkommen und Bedeutung in Lebensmitteln mit entsprechenden Literaturhinweisen geben MAGA (1978), PECHANEK et al. (1980, 1980a), ASKAR u. TREPTOW (1986), STRATTON et al. (1991) sowie BEUTLING (1996).

Phenylethylamin und Tyramin gehören zu den vasoaktiven Aminen. Sie wirken nach Aufnahme im Organismus durch induzierte Freisetzung von Noradrenalin aus den Granula der Nebennieren-Medulla blutdrucksteigernd (DALY u.

WITKOP, 1963; PECHANEK et al., 1980). Weiterhin ist bekannt, dass Phenylethylamin und Tyramin Serotonin aus seinen Verbindungen verdrängen und freisetzen können. Dieses führt v.a. in der Umgebung der Blutgefäße zur Hypersensibilisierung von sensiblen Nervenendigungen. Dadurch können schon an sich normale Reize als schmerzhaft empfunden werden, wie z.B. das Auflegen des Kopfes auf eine Unterlage. Des weiteren wird die Reizschwelle für Sinneswahrnehmungen schon bei der Aufnahme geringer toxischer Dosen dieser Amine empfindlich herabgesetzt, so dass eine verstärkte Lichtempfindlichkeit, Überempfindlichkeit des Gehörs sowie übersteigerte Geruchswahrnehmung auftreten, noch bevor es zu anderen Erscheinungen von Unwohlsein kommt (BEUTLING, 1996). Als Vergiftungserscheinungen treten Übelkeit, Erbrechen, Durchfall und klopfender, häufig einseitiger Kopfschmerz auf. In Einzelfällen kann es zur lebensbedrohlichen Hochdruckkrise mit Ruptur von Kapillaren im Gehirn kommen (JANZ et al., 1983). Die Symptome treten etwa 1-3 h nach Aufnahme entsprechender Amine auf und können bis zu 24 h anhalten. Weitere detaillierte Beschreibungen von Wirkungen auch anderer biogener Amine auf die einzelnen Organsysteme geben MARLEY und BLACKWELL (1970).

Die Intoxikationen durch Phenylethylamin und Tyramin werden von verschiedenen Autoren mit dem Bild der Migräne in engen Zusammenhang gebracht. Als Auslöser für Migräneattacken wird hier immer wieder der Verzehr von Schokolade genannt. Mehrere Arbeiten beschäftigen sich mit dem Gehalt der beiden Amine in Kakao und seinen Produkten (KENYHERCZ u. KISSINGER, 1977; HURST u. TOOMEY, 1981; ZIEGLEDER et al., 1992). Demnach sind Tyramin, Phenylethylamin und Serotonin die wichtigsten biogenen Amine in Kakao und Schokolade. Tyramin wurde in Konzentrationen zwischen 1 und 12 mg/kg und Phenylethylamin mit maximal 7 mg/kg nachgewiesen. Weitere Untersuchungen gibt es zum migräneauslösenden Einfluss von Tyramin und Phenylethylamin:

- Die Wirkung von Tyramin wurde bei 35 an ernährungsbedingter Migräne leidenden Personen durch HANINGTON (1974) im Vergleich mit Lactose als

Placebo-Präparat überprüft. Das Auftreten von Migräne nach 125 mg Tyramin war signifikant höher.

- SANDLER et al. (1974) untersuchten die Wirkung von β -Phenylethylamin in einer Dosis von 3 mg an 36 schokolade-sensitiven Migränepatienten. Bei der Hälfte der Versuchspersonen wurden Kopfschmerzen ausgelöst.
- Die Effekte von 25 mg Histamin, 25 mg Tyramin und 5 mg Phenylethylamin verabreicht in Apfelsaft wurden bei 27 gesunden Probanden von LÜTHY und SCHLATTER (1983) in einer Doppelblindstudie überprüft. Keine statistisch signifikanten Effekte wurden bei Histamin und Tyramin registriert, dagegen verursachte Phenylethylamin bei einigen Personen Symptome wie Kopfschmerzen, Schwindel und Übelkeit.

Weitere Arbeiten zum Thema Nahrungsmittel und Migräne in Bezug auf biogene Amine gibt es von DALTON (1975), MEDINA u. DIAMOND (1978), KOHLENBERG (1982) sowie PERKIN u. HARTJE (1983).

Als toxische Dosen für Phenylethylamin werden somit bei sensitiven Personen 3 mg (SANDLER et al., 1974; DALTON, 1975) bis 5 mg (LÜTHY u. SCHLATTER, 1983) angegeben. Die angegebene toxische Dosis für Tyramin liegt mit 25 mg (BLACKWELL et al., 1967) bis 250 mg (FEHLHABER, 1992) deutlich über der des Phenylethylamins. Für nicht-sensitive Personen liegt die angegebene toxische Dosis für Phenylethylamin bei 30 mg/kg und für Tyramin bei 100-800 mg/kg Lebensmittel (ten BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994).

Die Aminresorption aus Nahrungsstoffen hängt von einer Vielzahl von Rahmenbedingungen ab, wie z.B. dem Aggregatzustand des Lebensmittels, der Aufnahme weiterer Nahrungsinhaltsstoffe sowie der Aktivität der Monoaminoxidase (MAO) der Darmepithelien. Sie stellt die erste systematische Barriere für die Aminaufnahme in den Körper dar. Außerdem bieten die MAO des Blutes und die organlokalisierte MAO weiteren Schutz vor übermäßiger Aminaufnahme und -wirkung im Organismus (BEUTLING, 1996). Diese Barriere kann versagen, wenn die Aktivität der MAO in der Mucosa kongenital oder erworben insuffizient ist, wenn der Körper mit aminreicher Kost überlastet wird, d.h. oxidativ bzw. enzymatisch nicht zu bewältigende Aminmengen

auftreten oder die MAO durch Verabreichung von z.B. bestimmten Medikamenten gehemmt wird (MAO-Inhibitoren) (TÄUFEL, 1970). Werden die Amine intravenös appliziert bedarf es nur geringster Mengen, um beschriebene Vergiftungserscheinungen auszulösen.

Kommt es zur gleichzeitigen Aufnahme von Phenylethylamin und Tyramin verstärken sich die Symptome. SANDLER et al. (1974) vermuteten, dass Phenylethylamin die Aktivität der MAO vermindert. PALMFREYMAN et al. (1994) erbrachten den Beweis, dass Phenylethylabkömmlinge der Haloallylamine die MAO blockieren. Damit bewirkt Phenylethylamin eine Verstärkung des Effekts von Tyramin und anderen biogenen Aminen.

2.2.3. Chemisch-physikalische Eigenschaften des β -Phenylethylamins

Phenylethylamin gehört zu den Monoaminen. Es ist eine farblose Flüssigkeit, löslich in Wasser, Alkohol sowie Ether und zeigt eine stark basische Reaktion. β -Phenylethylamin bzw. 2-Phenylethylamin hat einen fischartigen Geruch.

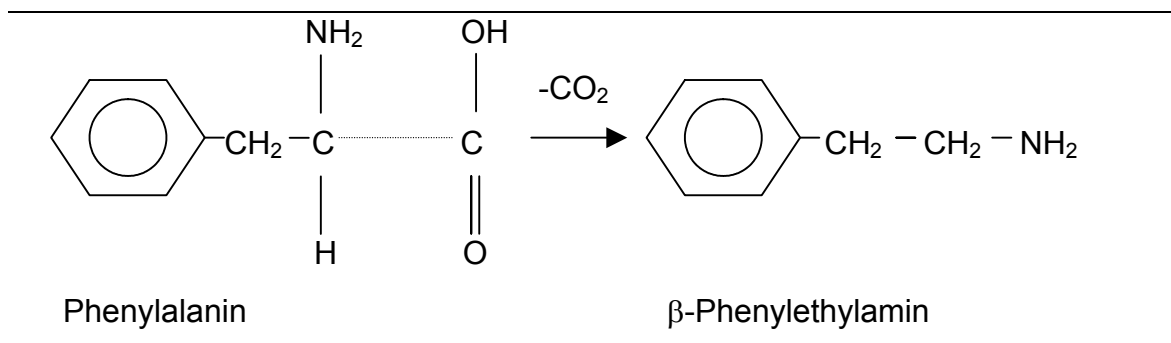
Es gilt als Stammsubstanz der Catecholamine und vieler Halluzinogene und wird mit dem Entstehen von Lust- und Glücksempfinden in Verbindung gebracht. Neben seinem Vorkommen in den verschiedensten Lebensmitteln wurde es auch im Gehirn und im Harn nachgewiesen, insbesondere nach Stresseinwirkung sowie bei psychotischen Erkrankungen (PAULOS u. TESSEL, 1982).

β -Phenylethylamin ist hitzestabil, sein Siedepunkt liegt bei 195 °C. Es bleibt bei einem weiten pH-Bereich (zwischen pH 5 und 11) chemisch stabil und physiologisch wirksam. Phenylethylamin besitzt ein Molekulargewicht von 121,18. Die Summenformel lautet $C_8H_{11}N$. Wegen seiner Eigenschaft, CO_2 zu absorbieren, wird es in der Industrie zur Synthese von pharmazeutischen Präparaten verwendet (FALBE u. REGITZ, 1991; BEUTLING, 1996).

2.2.4. Stoffwechsel des Phenylethylamins

Voraussetzung für die Bildung biogener Amine ist das Vorhandensein von L-Aminosäuren. Aus ihnen wird im Zuge einer Decarboxylierung Kohlendioxid gasförmig abgespalten (MÜLLER, 1986). Im Fall von Phenylethylamin wird L-Phenylalanin decarboxyliert.

Abb. 1: Decarboxylierung von Phenylalanin zu Phenylethylamin



Für diese Reaktion werden Enzyme, die Decarboxylasen, benötigt. Sie fungieren als Biokatalysatoren und sind meist substratspezifisch. Weiterhin ist für die Bildung von Phenylethylamin Pyridoxal-5-phosphat erforderlich, das als Coenzym für die Decarboxylase fungiert (BEUTLING, 1996).

JOOSTEN (1987) untersuchte verschiedene Einflussfaktoren auf die Bildung von biogenen Aminen in Käse. Er fand keine spezifische Decarboxylase für Phenylalanin. Auch in der Literatur waren bis dahin keine Angaben dazu gemacht worden. Er begründete die Bildung von Phenylethylamin mit der Affinität der Tyrosindecarboxylase zu Phenylalanin. Auch GALE (1957) sprach von der Umsetzung von Phenylalanin durch die Tyrosindecarboxylase. Er fand in seinen Untersuchungen heraus, dass diese Reaktion etwa 5-10 % der Decarboxylationsrate von Tyrosin ausmacht.

In den Ausführungen von BEUTLING (1996) wird eine spezifische L-Phenylalanindecarboxylase beschrieben. Sie ist in der Lage L-Phenylalanin sowie L-Tyrosin zu decarboxylieren.

Weiterhin ist die α -Aminosäuredecarboxylase benannt, welche in der Lage ist alle α -Aminosäuren zu biogenen Aminen umzusetzen.

L-Phenylalanindecaboxylase und L-Tyrosindecaboxylase, isoliert aus *Streptococcus faecalis*, erreichen ihr Wirkungsoptimum bei einem pH-Wert von 5,5 und 37 °C (SIGMA, 1999). Einen zusammenfassenden Überblick über genannte Enzyme zeigt Tabelle 7.

Tab. 7: Übersicht über L-Phenylalanin decarboxylierende Enzyme
(nach Beutling, 1996)

Aminosäure-decarboxylase	Internationale Nomenklatur	Spezifische Substrate
L-Phenylalanin-decarboxylase	EC 4.1.1.53	L-Phenylalanin L-Tyrosin
L-Tyrosin-Decarboxylase (TDC)	EC 4.1.1.25	L-Tyrosin L-Phenylalanin
α-Aminosäuren-decarboxylase	EC 4.1.1.26	alle L- α -Aminosäuren

Die Amine können über verschiedene Wege abgebaut werden. Der wichtigste Weg der physiologischen Inaktivierung ist die oxidative Desaminierung durch Aminoxidase.

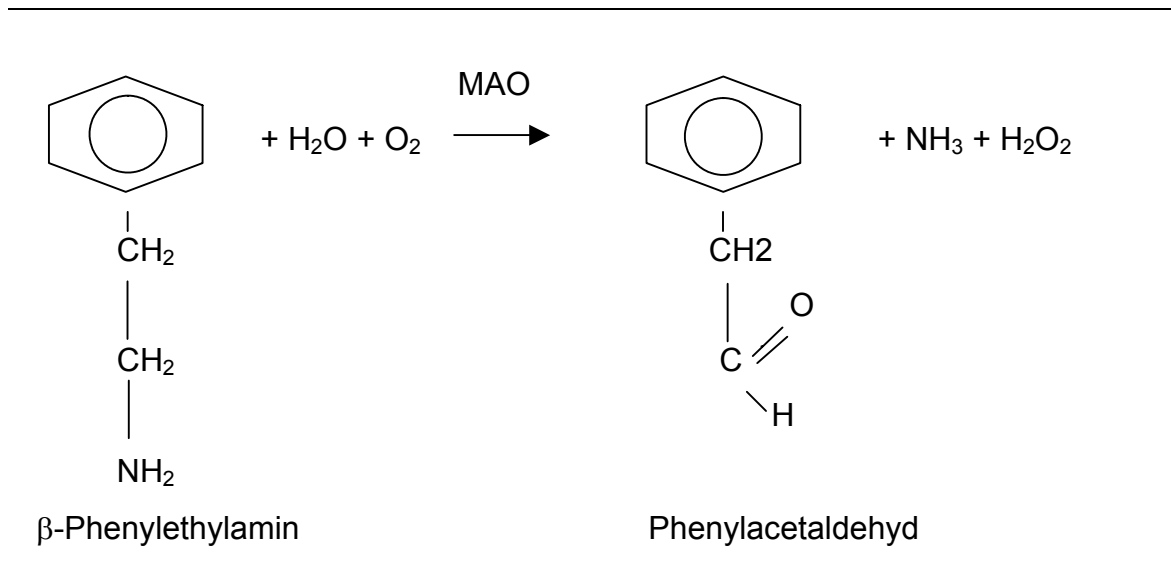
Daneben werden:

- N- und O-Methylierung durch N- und O-Methyltransferase,
- N-Acetylierung durch N-Acetyltransferase sowie
- Hydroxylierung durch Hydrolase beschrieben (ASKAR u. TREPTOW, 1986).

Der Abbau des Monoamins Phenylethylamin erfolgt mittels der Monoaminoxidase durch oxidative Desaminierung unter Abspaltung von Ammoniak mit Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt zum Phenylacetaldehyd (Abb. 2, S.32). Dieses ist in der Regel nicht unmittelbar faßbar und wird bevorzugt durch Aldehydoxidase zur toxikologisch indifferenten Phenyllessigsäure dehydriert, welche dann den Stoffwechselwegen der Fettsäuren folgt (TÄUFEL, 1970; SEILER et al., 1971; ASKAR u. TREPTOW, 1986). Auf diese Art (oxidative Desaminierung zu Aldehyden und Dehydrierung zur entsprechenden Säure) können die Monoaminoxidasen (EC 1.4.3.4.) und Diamonoxidasen (DAO, EC 1.4.3.6.) fast alle biogenen Amine und einfache

aliphatische Amine oxidieren. MAO und DAO finden sich z.B. in Leber, Lunge, Niere, Haut, Placenta und in der Mucosa des Dünndarms.

Abb. 2: Oxidative Desaminierung von Phenylethylamin zu Phenylacetaldehyd



Die Monoaminoxidasen sind in den Mitochondrien lokalisiert. Es sind Cu^{2+} -enthaltende Flavoproteine, die bei $35\text{ }^\circ\text{C}$ stabil sind und über $40\text{ }^\circ\text{C}$ einen raschen Aktivitätsabfall zeigen. Ein Wirkungsoptimum wurde bei einem pH-Wert über 7 beobachtet. Zahlreiche Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, *Clostridium fesceri*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina lutea* und *Streptococcus lactis* verfügen ebenfalls über Mono- und Diaminoxidasen (VOIGT u. EITENMILLER, 1978; ASKAR u. TREPTOW, 1986; BEUTLING, 1996a).

Monoaminoxidasen lassen sich immunologisch in MAO-A und MAO-B trennen. Typ A ist spezifisch für 5-Hydroxytryptamin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin. Typ B inaktiviert Phenylethylamin, Benzylamin und Methylhistamin. Tyramin und Tryptamin werden durch beide Monoaminoxidasen abgebaut (SANDLER et al. 1974; BEUTLING, 1996). Weiterhin wurden Semicarbazid-sensitive Aminooxidasen (SSAO) beschrieben, welche in der Lage sind, u.a. auch Phenylethylamin und Tyramin abzubauen. Sie wurden in der glatten

Muskulatur der Blutgefäße, im Blutplasma, im Gelenkknorpel sowie in Rinderlungen nachgewiesen (BEUTLING, 1996).

Im normalen Stoffwechsel scheint somit der Organismus durch die Wirkung der aminabbauenden Enzyme gegen ein Überangebot an alimentären oder bakteriellen biogenen Aminen geschützt. Diese Barriere kann versagen, wenn die Aktivität der Aminoxidasen kongenital oder erworben insuffizient ist. Eine wichtige Rolle bei der erworbenen Insuffizienz spielen hierbei die sogenannten Aminoxidasehemmer. Eine Reihe von Pharmaka, die oft in Dauertherapie verabreicht werden, v.a. Antidepressiva, sind als Aminoxidasehemmer anzusehen (TÄUFEL, 1970). Einige Beispiele für MAO-Hemmer sind: Iproniazid, Isocarboxazid, Nialamid, Pheniprazin, Phenoxypropazin, Mebanazin und Tranylcypromin. Auffällig ist, dass viele dieser Stoffe eine Ähnlichkeit mit β -Phenylethylamin aufweisen, es bildet die Ausgangsstruktur für die Gruppe der sympathomimetischen Amine (MARLEY u. BLACKWELL, 1970).

DALY und WITKOP (1963) beschreiben eine Verminderung der Monoaminoxidase durch eine Überfunktion der Schilddrüse sowie die monoaminoxidase-hemmende Wirkung von Thiamin.

Viele biogenen Amine selbst sind in der Lage Aminoxidasen zu hemmen. Phenylethylamin ist als Hemmer von MAO und DAO bekannt, während Tyramin nur MAO hemmt (VOIGT u. EITENMILLER, 1978; STRATTON et al., 1991). Durch diese Hemmwirkung werden die Wirkungen anderer biogener Amine verstärkt und verlängert.

Weitere Erläuterungen zu Aminoxidasen und deren Hemmung geben DALY und WITKOP (1963), MARLEY und BLACKWELL (1970), TÄUFEL (1970), STRATTON et al. (1991) sowie BEUTLING (1996).

2.3. Nachweisverfahren für Biogene Amine

Der bisherige Stand der Analysetechnik ermöglicht es noch nicht biogene Amine mit ausreichender Empfindlichkeit direkt nachzuweisen. Die Amine müssen umgewandelt bzw. chemisch verändert werden (SCHEUER u. RÖDEL, 1995). Weiterhin ist bei deren Analyse u.a. zu beachten, dass durch Mikroorganismen neue Amine entstehen bzw. abgebaut werden können, wobei verschiedene Einflussgrößen wie pH-Wert, Natriumchloridkonzentration, Temperatur und Zeit zu berücksichtigen sind (BERGANN, 1986; BEUTLING, 1996; GIFFEY, 1997). Weiterhin ist zu beachten, dass die Amine in Lebensmitteln nicht homogen verteilt sind, die Wasserlöslichkeit mit steigender Anzahl der C-Atome abnimmt und somit verschiedene Lösungsmittel (z.B. Methanol, Salzsäure, Perchloressigsäure, Trichloressigsäure) zur Extraktion der Amine Verwendung finden müssen (ASKAR u. TREPTOW, 1986; HURST, 1990).

Verschiedene Trennverfahren sind entwickelt worden: u.a. Papier- und Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtelektrophorese, Gaschromatographie, Massenspektrometrie, Flüssigchromatographie, Chromatographie im Aminosäureanalysator, Fluorometrische Methoden sowie Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (SEILER et al., 1971; ASKAR et al., 1972; VANDEKERCKHOVE u. HENDERICKX, 1973; VANDEKERCKHOVE, 1977; PECHANEK et al., 1983; KATZ, 1987; TREPTOW u. ASKAR, 1990; HERNÁNDEZ-JOVER et al., 1997).

In Anbetracht der in dieser Arbeit verwendeten Analysemethoden zur Bestimmung der biogenen Amine werden im Folgenden die Dünnschichtchromatographie sowie die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie näher beschrieben .

2.3.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

2.3.1.1. Allgemeines zur DC

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wird als einfaches Trennverfahren von Substanzgemischen und zur Identifizierung bzw. semiquantitativen Bestimmung

einzelner Komponenten eingesetzt. Die Methode fungiert häufig als Screening-Verfahren für bestimmte Stoffgruppen.

Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Verteilung der zu untersuchenden Substanzen in einer stationären und einer mobilen Phase, die sich in einem offenen System befinden (planare Trennschicht). Das Laufmittel, welches die mobile Phase darstellt, bewegt sich über eine dünne Schicht des Sorptionsmittels (stationäre Phase) und transportiert dabei die einzelnen Komponenten des Substanzgemisches je nach Löslichkeit und/oder Adsorptionsverhalten unterschiedlich weit. Die jeweilige Laufstrecke der Substanzen wird zu ihrer Identifizierung verwendet. Sie wird als R_f-Wert angegeben.

Die dünnschichtchromatographische Trennung erfolgt meist nach der „aufsteigenden Methode“. Die DC-Platte wird senkrecht mit der unteren Kante in das Laufmittel getaucht, welches infolge der Kapillarkräfte in der Beschichtung über die Plattenfläche nach oben gesaugt wird und dabei die zu trennenden Substanzen je nach Stoff unterschiedlich weit mitnimmt. Die Stoffgemische werden in bestimmten Abständen am unteren Rand der DC-Platte aufgetragen (STAHL; 1967).

Das Sorptionsmittel, welches je nach Trennproblem z.B. Kieselgel, Aluminiumoxyd, Polyamid, Cellulose oder Mischsubstanzen darstellt, wird mit gleichmäßiger Schichtdicke auf einem planaren, inerten Träger (Glasplatte, Aluminium- oder Kunststoff-Folie) aufgetragen und bildet so die stationäre Phase (DC-Platte). Die Zusammensetzung des Laufmittels (mobile Phase) sowie der Nachweis der Substanzflecken nach erfolgter Laufzeit richtet sich nach den jeweils nachzuweisenden Stoffen (siehe Kap. 3.1.). Weitere Erläuterungen zum Verfahren der Dünnschichtchromatographie finden sich u.a. bei RANDERATH, 1962; STAHL, 1967; KATZ, 1987 sowie BAUER et al., 1989.

2.3.1.2. Aminnachweis mittels DC

Verschiedene Autoren beschrieben den Nachweis biogener Amine mittels Dünnschichtchromatographie, wobei die zu untersuchenden Substanzgemische

bzw. Lebensmittelproben vorher entsprechend aufbereitet wurden, bzw. eine Extraktion der Aminfraktion erfolgte.

Bereits im Laboratoriumshandbuch von STAHL (1967) sind neben allgemeinen Angaben zur Dünnschichtchromatographie spezielle Trennverfahren für Amine beschrieben. Getestet wurden verschieden beschichtete Platten und verschiedene Laufmittel. Je nach verwendetem System lagen die Rf-Werte für Phenylethylamin zwischen 0,37 und 0,66.

SEILER et al. (1971) benennen die DC u.a. als allgemein anwendbares, unspezifisches Verfahren zum Nachweis biogener Amine im Zentralnervensystem. Die Autoren erwähnten die Identifizierung der Amine mittels Ninhydrinlösung.

ASKAR et al. (1972) untersuchten die zweidimensionale dünnschichtchromatographische Trennung der in Bananen vorkommenden Amin-Fraktion. Unter den nichtflüchtigen Aminen wurde β -Phenylethylamin, Tyramin, Serotonin, Propanolamin sowie Histamin nachgewiesen. Hierbei wurden die Amine mit 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DANS-Cl) umgesetzt und in Form der fluoreszierenden DANS-Amine dünnschichtchromatographisch getrennt und identifiziert. Bei der von ASKAR et al. gewählten Methode konnte der Nachweis der Amine im 10^{-10} Mol-Bereich erreicht werden.

VOIGT et al. (1974) untersuchten den Gehalt von Tyramin, Histamin und Tryptamin in 156 Käseproben mittels Dünnschichtchromatographie. Mit ihrer Methode konnten sie Gehalte bis 10 $\mu\text{g/g}$ nachweisen. VOIGT und EITENMILLER (1977) überprüften insgesamt 22 verschiedene dünnschichtchromatographische Systeme zur Extraktion und Quantifikation der oben genannten biogenen Amine. Dabei verglichen sie vorher beschriebene Extraktionsmethoden. Zur Sichtbarmachung der Substanzflecken verwendeten sie Ninhydrin oder Ortho-phthaldialdehyd.

BEUTLING (1992) benutzte zur Prüfung von Mikroorganismen (Citrobacter, Salmonella, Enterococcus, Lactobacillus) auf ihre Befähigung zur Bildung von Histamin und Tyramin in Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer (30 °C) und der Nährbouillon ebenfalls dünnschichtchromatographische Systeme. Für den

Nachweis von Histamin und Tyramin wurden zwei verschiedene Laufmittel verwendet;

- Histamin: Ethanol, Ammoniak-Lsg. 25%ig, Aqua dest. (60:20:20),
- Tyramin: iso-Propanol, Ammoniak, Aqua dest. (80:10:10).

Die Nachweisgrenzen wurden mit 0,1 µg/ml für Histamin und Tyramin angegeben. 1996 untersuchte die Autorin die Bildung von Phenylethylamin und Tyramin an 7 Laktobazillen- und 14 Enterokokkenstämmen. Zur Extraktion der Amine verwendete sie silicagelbeschichtete DC-Platten sowie iso-Propanol - Ammoniak - Aqua dest. im Verhältnis 8:1:1 als Laufmittelsystem. Die Farbentwicklung der Substanzflecken erfolgte nach Besprühen mit Ninhydrin-Reagenz. Die Rf-Werte betragen für Phenylethylamin 0,54 und für Tyramin 0,42.

SHALABY (1994) überprüfte an jeweils 10 Proben Wurst und Fisch den Gehalt von 8 biogenen Aminen, u.a. Phenylethylamin mittels Dünnschichtchromatographie. Er testete dabei 12 Laufmittelsysteme und wies die Substanzflecken über Dansylderivate der entsprechenden Amine nach. Die relative Standardabweichung für Phenylethylamin betrug ca. 7 %. Die Rf-Werte für PEA lagen je nach Laufmittelsystem zwischen 0,34 und 0,92.

NAGUIB et al. (1995) entwickelten eine dünnschichtchromatographische Methode zur Analyse von β -Phenylethylamin, Tyramin und 6 weiteren biogenen Aminen aus Fisch. Sie testeten 10 verschiedene Laufmittelsysteme. Die Sichtbarmachung der Substanzflecken erfolgte über UV-Licht nach Umsetzung der Amine mit Dansylchlorid. Die beste Trennung der Amine wurde beim Laufmittel Benzen : Triethylamin (5:1) erreicht. Die Rf-Werte lagen für PEA je nach Laufmittel zwischen 0,41 und 0,55.

2.3.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.3.2.1. Allgemeines zur HPLC

Das Ziel dieses Verfahrens ist ebenfalls die Auftrennung von Stoffgemischen. Dieses erfolgt jedoch im Vergleich zur Dünnschichtchromatographie in deutlich empfindlicherem und spezifischerem Maße. Mit Hilfe der HPLC können Amine bis in den Nanogramm-Bereich bestimmt werden.

Die Trennung erfolgt wieder durch eine Verteilung der Probenkomponenten zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase. Die mobile Phase (das Eluens) wird mit Hilfe einer Hochdruckpumpe durch die Trennsäule gedrückt. Die zu untersuchende Probe wird über einen Probeneinlaß, den sogenannten Injektor, in die mobile Phase eingebracht und zur Trennsäule befördert. Die Trennsäule ist mit Füllmaterial, welches die stationäre Phase trägt oder enthält, gepackt. Häufig besteht die Säulenfüllung aus einem inerten, meist hochporösem Trägermaterial, das auf seiner Oberfläche die eigentliche stationäre Phase trägt.

Die mobile Phase füllt den Raum zwischen den Füllmaterialteilchen und dem Porenvolumen in diesem aus, dabei wechseln die Probemoleküle sehr viele Male von der mobilen in die stationäre Phase und zurück. Die Verweildauer der Probenmoleküle ist durch deren unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit dem chromatographischen System verschieden, dadurch trennen sich die Substanzen und verlassen die Trennsäule zu unterschiedlichen Zeiten. Im Detektor werden sie anschließend vermessen und die Signale elektronisch weiterverarbeitet (ACED u. MÖCKEL, 1991; SCHMIDTKE, 1992).

Je nach Trennproblem werden verschiedene stationäre und mobile Phasen eingesetzt. Als stationäre Phase kommen häufig Silicagel, chemisch modifiziertes Silicagel, Styrol-Divinylbenzol, Aluminiumoxid, Magnesiumsilikat, poröses Glas und andere Trägermaterialien zum Einsatz (MEYER, 1990). Das Elutionsmittel muß ebenfalls den Anforderungen des Trennproblems entsprechen. U.a. werden gute UV-Durchlässigkeit oder günstiger Brechungsindex, ausreichende Reinheit, geringe Korrosionswirkung sowie eine

hervorragende Löslichkeit der Probe im Elutionsmittel gefordert (ENGELHARDT, 1985; EPPERT, 1988).

Die Einzelstoffe müssen nach der chromatographischen Trennung erfaßt werden. Diese Aufgabe übernimmt der Detektor, der das Konzentrationsprofil eines aus dem Trennungssystem tretenden Substanzpeaks verzerrungsfrei in ein elektrisches Signal übersetzt. Zur biochemischen Analyse am meisten verwendete Detektoren sind der UV-Detektor und der Fluoreszenz-Detektor:

- Der UV-Detektor mißt die Lichtabsorption durch die Lösung der Probenkomponenten der mobilen Phase. Voraussetzung dafür ist ein optisch total durchlässiges Eluens sowie Probensubstanzen, die ausreichend UV-Licht absorbieren (ACED u. MÖCKEL, 1991).
- Der Fluoreszenz-Detektor ist ein Lichtemissionsdetektor. Er ist selektiv für Substanzen, die entweder nativ oder nach Derivatisierung, z.B. mit DANS, o-Phthaldialdehyd, 9-Fluorenylchloroformiat, fluoreszieren (ROTH, 1971; BLAU u. HALKET, 1993). Dabei werden die Probenmoleküle mit monochromatischem UV-Licht bestimmter Wellenlänge bestrahlt, die diese zur Fluoreszenz anregen. Der Detektor mißt dann die Intensität der Fluoreszenzemission der entsprechend zu erfassenden Stoffe. Der Fluoreszenz-Detektor wird überwiegend im biochemischen Bereich eingesetzt, da dort relevante Verbindungen, wie z.B. Aminosäuren, keine ausreichende UV-Absorption haben (ACED u. MÖCKEL, 1991).

Weitere Detektoren sind u.a. der Brechungsindex-Detektor, das Differentialrefraktometer bzw. Viskosimeter, der Polarimeter-Detektor, der Leitfähigkeitsdetektor sowie elektrochemische Detektoren (HEISZ, 1987; MEYER, 1990; ACED u. MÖCKEL, 1991; KIRSCHBAUM, 1995).

HEISZ (1987) verglich die Empfindlichkeit verschiedener Detektoren und stellte fest, dass die nachweisbare Menge mit 10^{-12} g/10 µl Probenvolumen beim Fluoreszenzdetektor gegenüber den anderen Detektoren am geringsten war, d.h. hier die größte Empfindlichkeit vorlag. PETRIDIS und STEINHARDT (1995) fanden bei ihren Untersuchungen eine etwa zehnmal größere Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors gegenüber der UV-Detektion.

2.3.2.2. Aminnachweis mittels HPLC

Die in dieser Arbeit verwendete chromatographische Technik ist die Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed-Phase-Chromatographie). Hierbei ist die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase stark polar. Somit ist dieses Verfahren zur Auftrennung von polaren Verbindungen, wie sie auch biogene Amine, Aminosäuren, Peptide, Proteine und ähnliche Verbindungen darstellen, besonders geeignet. Die stationäre Phase stellen unpolare, auf Silikagel chemisch gebundene Alkylreste unterschiedlicher Länge dar, während als mobile Phase Mischungen hoher Polarität von Wasser-Methanol oder Wasser-Acetonitril dienen (HEISZ, 1987; ACED u. MÖCKEL, 1991).

Je unpolarer die Probesubstanzen sind, um so stärker werden sie von der stationären Phase festgehalten und umgekehrt. Durch die verschiedene Polarität der zu untersuchenden Substanzen und der darauf abgestimmten mobilen Phase erfolgt eine unterschiedliche Elution der einzelnen Komponenten und somit deren Auftrennung (MEYER, 1990).

Durch die Anwendung von Gradientensystemen können komplexe Probenmischungen durch Erhöhung der Elutionskraft chromatographisch in verkürzter Zeit wirksam getrennt werden. Dabei können drei Parameter des chromatographischen Systems gezielt verändert werden:

- Temperatur sowie die
- Flußrate,
- Eluenszusammensetzung.

Der gebräuchlichste Weg zur Beeinflussung ist die zeitlich programmierte Änderung der Eluenszusammensetzung. Hierbei kann speziell auf die Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in der mobilen Phase und damit auf ihre Retentionszeit (Zeit der Probenaufgabe bis zum Erscheinen eines Detektorsignals, Rf-Wert) eingegangen werden. Voraussetzung für dieses Verfahren ist die getrennte Förderung der verschiedenen Eluentien und deren Mischung. Dafür gibt es zwei Arbeitsweisen, das Niederdruck- und das Hochdruckmischungssystem (HEISZ, 1987; UNGER, 1989; ACED u. MÖCKEL, 1991). Letzteres wird in den eigenen Untersuchungen verwendet (siehe Kap. 3.1.).

Weiterführende Angaben zum Verfahren der HPLC finden sich u.a. bei ENGELHARDT (1985), KATZ (1987), HEISZ (1987), EPPERT (1988), UNGER (1989), HURST (1990), ACED u. MÖCKEL (1991), SCHMIDTKE (1992) und KIRSCHBAUM (1995).

Wenige Autoren beschäftigten sich mit der direkten Bildung von biogenen Aminen, speziell Phenylethylamin durch Enterokokken.

SCHNELLER et al. (1997) untersuchten den Gehalt an biogenen Aminen in verschiedenem Käse, hergestellt aus pasteurisierter Milch, frischer Rohmilch und 36 Stunden gelagerter Rohmilch. Gleichzeitig wurde der Gehalt an Fermentationsorganismen gemessen. Die Analyse (HPLC) der biogenen Amine erfolgte mittels Dansylchloridderivatisierung, einer 5 µm Nucleosil C18 Säule und einem Fluoreszenzdetektor. Die Nachweisgrenze lag bei < 1 mg/kg. Die Enterokokkenzahl war in gelagerter Rohmilch am höchsten, gleichzeitig war festzustellen, dass der Phenylethylamingehalt in aus solcher Milch hergestelltem Käse besonders hoch war.

STRAUB et al. (1995) analysierten die Bildung von biogenen Aminen durch Fermentationsorganismen. Die Bildung von Phenylethylamin wurde bei einigen Stämmen, z.B. Streptococcus epidermidis und Streptococcus piscifermentans mittels HPLC nachgewiesen. Enterokokken wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

In neuesten Untersuchungen wurde von JUHLS et al. (1999) der Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Bildung von PEA durch einige Enterokokkenstämme geprüft. Die Autoren stellten fest, dass bei 30 °C und 40 °C die höchsten PEA-Konzentrationen erreicht wurden. Phenylethylamin wurde hierbei mittels HPLC analysiert. Es wurde eine Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phtaldialdehyd durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag mit dieser Methode bei 0,04 mg/l.

Weitere Literaturarbeiten beschäftigen sich mit der HPLC-Analyse von biogenen Aminen direkt oder aus Lebensmitteln.

Die Nachweisgrenzen für PEA werden in der Literatur bei Derivatisierung und Fluoreszenzdetektion zwischen 0,5 mg/kg und 1,5 mg/kg angegeben

(BÜTIKOFER et al., 1990; STRAUB et al., 1993; HERNÁNDEZ-JOVER et al., 1996; VALE u. GLÓRIA, 1997).

ETTER et al. (1990) entwickelten eine allgemeine Vorschrift zur Analyse von biogenen Aminen in Lebensmitteln. Sie untersuchten mit der beschriebenen Methode rund 250 Lebensmittelproben. Die Autoren verwendeten ein HPLC-Gradientensystem mit einer Lichrospher RP-18 Säule (Reversed Phase-System). Die Amine wurden mit Dansylchlorid derivatisiert und anschließend in Serie sowohl durch UV- als auch durch Fluoreszenzdetektion erfasst.

Mehrere Untersucher entwickelten verschiedene Methoden zum Nachweis biogener Amine direkt bzw. in Lebensmitteln mit Hilfe der HPLC.

Eine Literaturlauswahl dazu gibt Tab. 8.

Erläuterungen zu Tab. 8:

Amine

Pea : Phenylethylamin
Tyr : Tyramin
His : Histamin
Put : Putrescin
Cad : Cadaverin
Try : Tryptamin
Spe : Spermidin
Spr : Spermin
Ser : Serotonin
Eta : Ethanolamin
Eth : Ethylamin
Met : Methylbutylamin
Agm : Agmatin
Dah : Diaminoheptan

Derivatisierungsreagenz

DANS : Dansylchlorid
OPA : o-Phthaldialdehyd
FMOC : 9-Fluorenylmethylchloroformiat
BENZ : Benzoylchlorid
DABSYL : Dabsylchlorid

Detektor

UV : UV-Detektor
FL : Fluoreszenzdetektor

Tab. 8: Literaturübersicht zum Nachweis biogener Amine mittels HPLC

Probe	Amin	Derivat	Detektor	Autor (Jahr)
Wurst, Käse, Schokolade	Pea, Tyr, Try	-	UV	Koehler und Eitenmiller (1978)
Käse	Pea, Tyr, His, Put, Cad	DANS	FL	Bütikofer et al. (1990)
ägyptische Wurst	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Try, Spe, Spr	DANS	UV	Shalaby (1993)
gem. Hackfleisch	Pea, Tyr, His, Put	OPA	FL	Straub et al. (1993)
Oliven	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Try, Spe, Spr	DANS	UV	Horneo-Méndez u. Garrido-Fernández (1994)
Käse, Wurst, Milch, Bier, Wein fermentierte	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Try, Eta, Eth	OPA	FL	Petridis und Steinhart (1995)
Fleischerzeugnisse	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Spe, Spr	FMOC	FL	Scheuer und Rödel (1995)
Käse, Wein, Wurst	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Try, Spe, Spr, Ser, Met	DABSYL	FL	Bockhardt et al. (1996)
Fisch	His, Put, Cad, Spe, Spr	DANS	FL	Malle et al. (1996)
Fisch, Käse, Wurst	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Try, Spe, Spr	DANS	UV	Moret u. Conte (1996)
Fleisch u. Fleischprodukte	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Try, Spe, Spr, Agm	OPA	FL	Hernández-Jover et al. (1996)
Fisch	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Try, Spe, Spr, Agm	BENZ	UV	Hwang et al. (1997)
Schafskäse	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Spe, Iso	DANS	UV / FL	Ordóñez et al. (1997)
fermentierte Wurst	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Try, Spe, Spr, Dah	DANS	UV / FL	Paulsen et al. (1997)
Käse	Pea, Tyr, His, Put, Cad, Try, Spe, Spr, Agm, Ser	OPA	FL	Vale u. Gloria (1997)
Thunfisch	His	OPA	UV / FL	Frattini u. Lionetti (1998)