

4. Diskussion und Schlussfolgerungen

Isolierung und Differenzierung der Enterokokkenstämme

In der Literatur gibt es viele Untersuchungen zum Vorkommen von Enterokokken in Lebensmitteln. Bei den eigenen Untersuchungen diente die Isolierung und Differenzierung der Enterokokken aus den verschiedenen Medien der weiteren Untersuchung auf ihre Fähigkeit biogene Amine, hier speziell Phenylethylamin und Tyramin, bilden zu können. Die Bedeutung der Enterokokken als Indikatorkeime für fäkale Verunreinigungen, Verursacher von Lebensmittelintoxikationen sowie Starterorganismen ist im Kapitel 2.1.2. eingehend erläutert worden.

In den eigenen Untersuchungen wurden Proben von Käse und Schweinehackfleisch sowie Abstriche von Schweine- und Rinderschlachtkörpern sowie Hühnerdarm untersucht. Den Hauptanteil von allen gefundenen Enterokokken machte mit fast 50 % *Ec. faecalis* aus. Danach folgten *Ec. faecium*, *Ec. hirae* und *Ec. durans*. *Ec. gallinarum* und *Ec. casseliflavus* wurden nur vereinzelt gefunden. Auch in der Literatur stellen *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* die am meisten isolierten Enterokokkenspezies aus Lebensmitteln dar. Sie sind damit die am häufigsten untersuchten Spezies der Enterokokkengruppe (GARG u. MITAL, 1991; BEUTLING, 1994; GIRAFFA et al., 1995; WALTER u. BEUTLING, 1999; SUZZI et al. 2000; GARDINI et al. 2001).

Aus den Proben von Schweine- und Rinderschlachtkörpern wurden in den eigenen Untersuchungen zum überwiegenden Teil *Ec. faecalis* isoliert. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von KLEIN et al. (1998), die aus Schweine- und Rinderhackfleisch 209 Enterokokkenstämme, davon 87 % *Ec. faecalis* isolierten. Bemerkenswert ist hierbei allerdings das Ergebnis der eigenen Untersuchungen der Schweinehackfleischproben. Hier wurden zu gleichen Teilen *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* isoliert, was im Widerspruch zu den Untersuchungen von KLEIN et al. (1998) steht. Bei den Untersuchungen dieser Autoren machte *Ec. faecium* nur 4 % der Gesamtenterokokkenspezies aus. In

den eigenen Untersuchungen war diese Stammgruppe mit ca. 8-15 % aus den Schlachtkörperproben und 31,5 % aus Schweinehackfleisch wesentlich stärker vertreten.

Ebenso wie in den Untersuchungen von TURTURA und LORENZELLI (1994), die Enterokokken von frischen Hühnerbeinen isolierten, stellten *Ec. faecalis* (40 %) und *Ec. faecium* (26,7 %) den Hauptanteil der gefundenen Enterokokkenspezies dar. Die genannten Autoren fanden außerdem noch Stämme von *Ec. avium* und *Ec. durans*. Diese konnten in den eigenen Untersuchungen nicht isoliert werden. Hingegen wurden Stämme der Spezies *Ec. hirae* gefunden, die mit 20 % einen nicht außer acht zu lassenden Anteil darstellten.

Auch in den untersuchten Käseproben wurden im Hauptanteil mit 40,7 % *Ec. faecalis* Stämme isoliert. Es folgten *Ec. faecium* mit 18,6 % und *Ec. durans* mit 11,1 % am Gesamtanteil der gefundenen Enterokokkenstämme aus Käse. In den Untersuchungen anderer Autoren zum Vorkommen von Enterokokken in Käse sind die oben genannten Spezies ebenfalls Hauptbestandteil der Enterokokkenflora. Dabei variierten die Anteile der aufgeführten Spezies in Abhängigkeit von der Käsesorte und der Produktion (siehe Kap. 2.1.2.4.). Nicht immer nimmt hier *Ec. faecalis* den Hauptanteil an den gefundenen Enterokokkenspezies ein. In KIELWEIN's Untersuchungen (1977) wurden in Hart- und Weichkäse im Hauptanteil *Ec. durans* Stämme isoliert, während bei den untersuchten halbfesten Schnittkäsen *Ec. faecalis* überwog und im festen Schnittkäse die Stämme der *Ec. faecium* Gruppe den größten Teil ausmachten. Gleiche Ergebnisse brachten die Untersuchungen von BRANDL et al. (1985). Auch hier wurden bei Edamer- und Geheiratskäse im Hauptanteil *Ec. faecium* und bei Butterkäse am meisten *Ec. faecalis* Stämme isoliert. SUZZI et al. (2000) untersuchten Proben von italienischem Ziegenkäse auf ihren Gehalt an Enterokokken in den verschiedenen Reifestadien. Dabei veränderte sich der Anteil der oben genannten Enterokokkenspezies *Ec. faecalis*, *Ec. faecium* und *Ec. durans* während der Reifung. Am Ende der Reifungszeit überwog hier der Anteil an *Ec. faecium* vor *Ec. faecalis* und *Ec. durans*. Die Spezies *Ec. durans* spielte mit 3 % im Reifeendstadium in dieser Arbeit nur eine untergeordnete

Rolle. Anders als bei vorher genannten Autoren nahm in den eigenen Untersuchungen *Ec. durans* mit 11,1 % am Enterokokkenanteil in Käse einen zu beachtenden Teil ein. Die anderen Enterokokkenspezies spielen sowohl in den eigenen Untersuchungen als auch bei den oben genannten Arbeiten nur eine untergeordnete Rolle.

Hervorzuheben ist aber, dass in den eigenen Untersuchungen keine Unterteilung der Käsesorten vorgenommen wurde, so dass ein Vergleich des Vorkommens der einzelnen Enterokokkenspezies in Käse mit oben genannten Arbeiten nur bedingt möglich ist.

Aus allen Arbeiten einschließlich den eigenen Untersuchungen geht jedoch hervor, dass Enterokokken einen wesentlichen Teil der Mikrobenflora bestimmter Lebensmittel, sowohl beim Rohmaterial als auch im fertigen Lebensmittel ausmachen. In der Literatur lassen sich zahlreiche Untersuchungen verschiedener Autoren zu Keimzahlen von Enterokokken in Lebensmitteln finden, die diese Aussage unterstreichen, z.B.: GATTI et al. (1993), HALÁSZ et al. (1994), PRAŠOVSKÁ et al. (1991), KLEIN et al. (1998), BOVER-CID et al. (2000a), SUZZI et al. (2000), BOVER-CID et al. (2001a).

Phenylethylamin- und Tyraminbildung der geprüften Enterokokkenspezies

Im Schrifttum finden sich nur wenige Untersuchungen zum Aminbildungsvermögen der einzelnen Enterokokkenspezies. Meist werden dabei nur Angaben zu *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* gemacht.

In den eigenen Untersuchungen wurde die Aminbildung an einem *Ec. faecalis* Stamm, dem Referenzstamm Fs 202, über einen Zeitraum von 72 Stunden im 24 Stundenabstand analysiert. Die Tyraminbildung hatte nach 24 Stunden Bebrütung den höchsten Wert erreicht, während Phenylethylamin bis zu 72 Stunden Bebrütung weiter anstieg. Die Keimzahl schwankte nach 24 Stunden Bebrütung nur leicht (siehe Kap. 3.3.4.1.). Es ist zu berücksichtigen, dass Phenylalanin im Überschuß vorlag und Tyrosin nur in solcher Menge bemessen war, dass es innerhalb von 24 Stunden zu Tyramin umgesetzt werden konnte. Da die anderen Bedingungen für die Aminbildung optimal waren, kann vermutet

werden, dass hier das Substrat einen großen Einfluss auf deren Bildung hatte. Auch andere Autoren beschrieben das Vorhandensein von freien Aminosäuren für die Aminbildung als limitierenden Faktor (EITENMILLER et al., 1978; CHANG, 1985; JOOSTEN, 1988). Wäre Phenylalanin ebenfalls begrenzt vorhanden, hätte man evtl. den gleichen Aminbildungsverlauf erhalten wie für Tyramin.

Die Arbeit von GIRAFFA et al. (1995) unterstützt diese Aussage teilweise. Die Autoren untersuchten einen *Ec. faecalis* und drei *Ec. faecium* Stämme, welche vorher auf ihre Decarboxylasetätigkeit positiv getestet waren, auf ihr Vermögen biogene Amine zu bilden. Dabei bebrüteten sie die Mikroben bei 37 °C über 72 Stunden. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 6,6 eingestellt. In der einen Testreihe gaben die Autoren 0,2 g/l der entsprechenden Vorläuferamino-säuren (Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin) hinzu, in der anderen Versuchsgruppe wurde ohne diese gearbeitet. Im Ergebnis war ohne Zusatz der entsprechenden Aminosäuren nur der *Ec. faecalis* Stamm in der Lage Phenylethylamin und Tyramin zu bilden. Außerdem wurde von diesem Stamm Putrescin und Spermidin gebildet. Bei dem ersten *Ec. faecium* Stamm wurde Phenylethylaminbildung nachgewiesen ohne jegliche andere Aminbildung. Der zweite *Ec. faecium* Stamm konnte nach 72 Stunden Bebrütung nur Tyramin und Spermin bilden. Bei Zusatz der oben genannten Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin) konnte dieser *Ec. faecium* Stamm mehr Tyramin und Spermin bilden, außerdem wurde Spermidin nachgewiesen. Der dritte *Ec. faecium* Stamm bildete ohne Zusatz von Aminosäuren keines der gesuchten Amine. Nach Zusatz konnten Tyramin, Spermin und Spermidinbildung nachgewiesen werden. Der erste *Ec. faecium* Stamm, bei dem ohne Zusatz von Aminosäuren nur Phenylethylamin gefunden wurde, bildete nach Zusatz der entsprechenden Aminosäuren weniger Phenylethylamin als ohne Zusatz. Zusätzlich konnte die Bildung von Tyramin, Spermidin und Spermin nachgewiesen werden. Somit betrug der relative Anteil des Phenylethylamins am Gesamtaminanteil bei diesem *Ec. faecium* Stamm nur noch 9 %. Der *Ec. faecalis* Stamm bildete nach Zusatz der entsprechenden Aminosäuren mehr Phenylethylamin und Tyramin. Anstelle von Putrescin

konnte nun nach 72 Stunden Bebrütung Cadaverin nachgewiesen werden. Außerdem bildete der untersuchte *Ec. faecalis* Stamm noch Spermidin und Spermin, so dass der relative Anteil der Amine Phenylethylamin und Tyramin im Vergleich zur gebildeten Gesamtaminmenge beim Zusatz der entsprechenden Vorläuferaminosäuren sank. Es sei herausgestellt, dass die Stämme, welche ohne Zusatz von Vorläuferaminosäuren kein Phenylethylamin bildeten (2. und 3. *Ec. faecium* Stamm), dies auch durch Zugabe von Phenylalanin nicht taten. Alle von den Autoren untersuchten Enterokokkenstämme konnten nach Zugabe der Vorläuferaminosäuren Tyramin bilden. Histamin wurde bei allen Stämmen nicht nachgewiesen.

GARDINI et al. (2001) untersuchten den Einfluss von pH, Temperatur, NaCl-Gehalt und Proteolyse auf die Bildung biogener Amine bei *Ec. faecalis*. Die Proteolyse, welche der Bereitstellung der Aminosäuren dient, die dann zu biogenen Aminen umgesetzt werden, schien in ihren Augen kein begrenzender Faktor zu sein. Sie stellten das Wachstum der Mikroben als hauptsächlich limitierenden Faktor für die Aminbildung dar. Weiterhin war der pH-Wert ein Schlüsselfaktor. In den Untersuchungen von GARDINI et al. (2001) stellte Phenylethylamin gefolgt von Tyramin das wichtigste biogene Amin dar. Seine Konzentration war in 14 von 17 Untersuchungsreihen am höchsten. In drei Meßreihen wurde etwas mehr Tyramin als Phenylethylamin analysiert. Die biogenen Amine wurden mittels HPLC gemessen. Bei den eigenen Untersuchungen an *Ec. faecalis* Stämmen aber auch an den anderen untersuchten Enterokokkenspezies konnte dagegen kein Unterschied der Aminbildung bei wachstumsstarken gegenüber wachstumsschwächeren Stämmen beobachtet werden. Die Tyraminkonzentrationen der ausgesuchten *Ec. faecalis* Stämme lagen in den eigenen Untersuchungen etwa in der gleichen Größenordnung. Nur einer von zwei ausgesuchten wachstumsschwächeren *Ec. faecalis* Stämmen bildete mit ca. 250 µg/ml ein Viertel Phenylethylamin der anderen *Ec. faecalis* Stämme.

JUHLS et al. (1999) testeten den Einfluss der Temperatur auf das Vermögen Phenylethylamin zu bilden bei je zwei *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* Stämmen. Alle Prüfstämme bildeten Phenylethylamin. Bei 30 °C und 40°C wurden die

höchsten Konzentrationen des Amins gefunden. Es wurden Mengen zwischen 520/760 µg/ml (*Ec. faecium*) und 890/980 µg/ml (*Ec. faecalis*) nachgewiesen. Auch in den eigenen Untersuchungen konnten die *Ec. faecalis* Stämme die untersuchten Amine in größeren Mengen bilden als die *Ec. faecium* Stämme.

BOVER-CID et al. (2000) untersuchten das Aminbildungsvermögen an 16 Enterokokkenstämmen (11 *Ec. faecalis*, 5 *Ec. faecium*). Sie bebrüteten die Stämme bei 30 °C und gaben entsprechende Vorläuferaminosäuren hinzu. Leider wurden weder Bebrütungszeit noch Keimzahlen angegeben. Alle untersuchten *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* Stämme bildeten Phenylethylamin und Tyramin. Bei *Ec. faecalis* wurde Phenylethylamin in Mengen von 80-585 µg/ml nachgewiesen. In den eigenen Untersuchungen wurde etwa 2-3 mal mehr Phenylethylamin (ca. 260-1100 µg/ml) bei den untersuchten *Ec. faecalis* Stämmen gefunden. Dagegen konnten die genannten Autoren bis 4 mal soviel Tyramin (419-3763 µg/ml) bei ihren untersuchten *Ec. faecalis* Stämmen nachweisen als in den eigenen Untersuchungen (824-949 µg/ml) analysiert wurde.

BOVER-CID et al. (2000) fanden bei ihren untersuchten *Ec. faecium* Stämmen Phenylethylaminmengen von 40-432 µg/ml. Dies entspricht der Größenordnung an gebildetem Phenylethylamin, wie sie auch in dieser Arbeit gefunden wurde (nicht nachweisbar bis 505,1 µg/ml). Dagegen konnten die Autoren bei ihren *Ec. faecium* Stämmen mit 474-4337 µg/ml wesentlich mehr Tyramin, etwa 1,5-5 mal mehr, nachweisen als bei den *Ec. faecium* Stämmen in den eigenen Untersuchungen gefunden wurde (754,4-858,6 µg/ml). Während oben genannte Autoren bei allen ihren untersuchten Enterokokkenstämmen Phenylethylamin nachwiesen, konnte einer von drei in dieser Arbeit untersuchten *Ec. faecium* Stämme (Fc 304) zwar Tyramin aber kein Phenylethylamin bilden. Es sei noch bemerkt, dass BOVER-CID et al. (2000) in den angeführten Untersuchungen bei ihren Enterokokkenstämmen keine anderen biogenen Amine nachweisen konnten. Die Analyse erfolgte mittels HPLC. Den Ausführungen der oben genannten Autoren, dass die Aminproduktion nicht von der Spezies selber, sondern vom einzelnen Stamm abhängt, kann sich hier vor allem Bezug

nehmend auf die untersuchten *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* Stämme aber auch auf die anderen untersuchten Enterokokkenspezies, angeschlossen werden.

Dies wird ebenso unterstützt durch die Untersuchung von VOIGT und EITENMILLER (1977a), welche 3 *Streptococcus faecalis* Stämme auf ihre Tyrosindecarboxylaseaktivität untersuchten. Nur bei einem *Str. faecalis* Stamm konnte Tyrosindecarboxylasetätigkeit nachgewiesen werden. EDWARDS und SANDINE (1981) konnten in einem aus Käse isoliertem *Str. faecalis* Stamm Tyrosindecarboxylasetätigkeit nachweisen.

Bei den Untersuchungen von BOVER-CID und HOLZAPFEL (1999) zur Entwicklung eines Screeningverfahrens zum Testen von Milchsäurebakterien auf ihre Aminbildungskapazität wurden 26 Enterokokkenstämme (15 *Ec. faecalis*, 10 *Ec. faecium*, 1 *Ec. durans*) auf ihr Tyraminbildungsvermögen untersucht. Die Fähigkeit Phenylethylamin zu bilden wurde nicht geprüft. Alle untersuchten Stämme waren in der Lage Tyramin, teilweise in beträchtlichen Mengen, zu bilden (*Ec. faecalis* 601-4986 µg/ml, *Ec. faecium* 379-4339 µg/ml, *Ec. durans* 610 µg/ml; Bebrütung bei 37 °C über 4 Tage). In den eigenen Untersuchungen konnten nur zwei von fünf untersuchten *Ec. durans* Stämmen Phenylethylamin und Tyramin bilden.

Ähnliche Erfahrungen machten auch SUZZI et al. (2000). Sie untersuchten Enterokokken, isoliert aus italienischem Ziegenkäse, unter anderem auf ihr Aminbildungsvermögen. Auch hier wurde die Kapazität der Stämme Phenylethylamin zu bilden nicht geprüft. Von den insgesamt 117 Stämmen zeigten alle *Ec. faecalis* (79), *Ec. faecium* (16) sowie *Ec. hirae* Stämme (2) Tyraminbildung. Bei den untersuchten *Ec. durans* (6) und *Ec. gallinarum* (1) Stämmen konnte diese Eigenschaft nicht nachgewiesen werden. Die zwei *Ec. gallinarum* Stämme der eigenen Untersuchungen konnten ebenfalls kein Tyramin aber auch kein Phenylethylamin bilden.

In den eigenen Untersuchungen konnte bei allen *Ec. hirae* Stämmen eine beträchtliche Phenylethylamin- und Tyraminbildung nachgewiesen werden. Diese Stämme bildeten insgesamt Phenylethylaminmengen von 936,2-1729,3 µg/ml und Tyraminmengen von 809,3-1022,0 µg/ml. Damit war die Stammgruppe *Ec. hirae* unter den untersuchten Enterokokkenspezies diejenige,

mit dem größten Potenzial die genannten Amine zu bilden. Damit wurde erstmals Phenylethylamin- und Tyraminbildung durch *Ec. hirae* Stämme nachgewiesen. Entsprechende andere Angaben in der Literatur sind der Autorin nicht bekannt.

Bei den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen schien der pH-Wert keinen großen Einfluss auf die Bildung der untersuchten Amine zu haben, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Bakteriensuspension aller geprüften Enterokokken nach 72 Stunden Bebrütung bei 30 °C pH-Werte zwischen 4,03 und 5,57 aufwies, also immer im sauren Bereich lagen. Das Optimum der mikrobiellen Decarboxylasen wird u.a. in der Literatur mit pH 5-6,5 (EDWARDS u. SANDINE, 1981) bzw. pH 5-7 (BEUTLING, 1996b), also in diesem Bereich angegeben. Bei den untersuchten *Ec. faecalis* Stämmen lag der pH-Wert der Stämme zwischen 4,03 und 4,25. Die Aminbildung war bei diesen Stämmen recht gleichmäßig (siehe Kap. 3.3.4.1. und 3.3.4.2.). Die pH-Werte der geprüften *Ec. faecium* Stämme lagen bei 4,23, 4,31 und 4,61 beim Stamm Fc 304, der gleichzeitig der einzige geprüfte *Ec. faecium* Stamm war, der kein Phenylethylamin bilden konnte. Bei diesem Stamm wurde nur Tyramin nachgewiesen (Kap. 3.3.4.3.). Bei den untersuchten *Ec. durans* Stämmen (Kap. 3.3.4.4.) lagen die pH-Werte der Bouillon nach 72 Stunden Bebrütung zwischen 4,10 und 4,22. Eine Ausnahme war der Stamm D 203, bei dem der pH-Wert 5,57 betrug. Im Gegensatz zur Speziesgruppe der *Ec. faecium* Stämme, wo bei dem Stamm mit der schlechtesten Säuerung kein Phenylethylamin nachgewiesen wurde, war der Stamm D 203 in der Lage am meisten Phenylethylamin zu bilden. Bei den untersuchten *Ec. hirae* Stämmen lagen die erreichten pH-Werte zwischen 4,17 und 4,46, wobei der Stamm mit der größten Säuerung (H 402, pH 4,17) am wenigsten Phenylethylamin und Tyramin bilden konnte (Kap. 3.3.4.5.). Bei den geprüften Stämmen der Spezies *Ec. gallinarum* und *Ec. casseliflavus* (Kap. 3.3.4.6.) lagen die pH-Werte zwischen 4,09 und 4,14, bei diesen Stämmen konnte keine Aminbildung nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine Speziespezifität für das Potenzial Phenylethylamin und Tyramin zu bilden, hinweisen.

Die Untersuchungen zeigen unterschiedliche Aminbildung unabhängig vom erreichten pH-Wert. Es ist daher zu überlegen, ob es vielleicht mehrere Decarboxylasen mit unterschiedlichem pH-Optimum gibt. GARDINI et al. (2001), die den Einfluss von verschiedenen Faktoren u.a. auch den Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von biogenen Aminen an einem *Ec. faecalis* Stamm untersuchten, kamen zu dem Schluss, dass der pH-Wert eine Schlüsselrolle im Aminbildungsvermögen darstellt. Sie führten 17 Meßreihen durch, bei denen der pH-Wert zwischen 5,4 und 7,0 lag, die größte Aminmenge wurde bei einem pH-Wert von 6,6 bei Temperaturen von 23 °C bis 30 °C gebildet. Allerdings wurden auch andere Faktoren wie Temperatur und Salzkonzentration verändert. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Aminbildung von der Wachstumsaktivität der Bakterien abhängt und nicht von den Wachstumsbedingungen per se. Wobei die Umgebungsbedingungen sicherlich entscheidenden Einfluss auf die Wachstumsaktivität der Mikroben haben. Alle diese Untersuchungsergebnisse unterstützen bereits oben ausgeführte These, dass die Kapazität biogene Amine zu bilden individuell vom Stamm abhängt und nicht auf eine Speziesgruppe verallgemeinert werden sollte.

Ein direkter Zusammenhang zwischen Phenylethylamin- und Tyraminbildung konnte in den eigenen Untersuchungen nicht gezeigt werden. So gab es zum Beispiel innerhalb der Stammgruppe der *Ec. faecalis* Stämme vier Stämme, die mehr Phenylethylamin als Tyramin bilden konnten und zwei Stämme, bei denen dieses Verhältnis umgekehrt war. Bei den *Ec. faecium* Stämmen gab es einen Stamm, der zwar in der Lage war, Tyramin aber nicht Phenylethylamin zu bilden. Bei den anderen Stämmen dieser Speziesgruppe konnte im Verhältnis zu Phenylethylamin mehr Tyramin nachgewiesen werden. Dagegen wurde bei allen aminbildenden Stämmen der *Ec. durans* sowie bei den Stämmen der *Ec. hirae* Gruppe mehr Phenylethylamin als Tyramin gebildet. Es zeigte sich jedoch, dass außer bei dem *Ec. faecium* Stamm Fc 304, wo nur Tyramin nachgewiesen wurde, bei allen untersuchten Enterokokkenstämmen entweder beide untersuchten biogenen Amine oder keines dieser Amine bestimmt werden konnte. Diese Ergebnisse sind jedoch nur begrenzt aussagefähig, da in

den Untersuchungen mit unterschiedlichen Mengen an zugegebenen Ausgangssubstanzen gearbeitet worden ist. Phenylalanin lag hier, im Gegensatz zu Tyrosin, im Überschuß vor. Auch im Lebensmittel direkt gibt es normalerweise kein Überangebot von Phenylalanin. Dies begrenzt die Möglichkeit der vorhandenen Enterokokken im Lebensmittel selbst Phenylethylamin zu bilden. Zu berücksichtigen ist dabei der Aspekt des Vorhandenseins von Bakterienmischkulturen im Lebensmittel. Befinden sich darunter Proteolyten (z.B. *Ec. faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*), die in der Lage sind, durch Eiweißabbau entsprechende Vorläuferaminosäuren freizusetzen, kann unter bestimmten Bedingungen schnell genügend Substrat (Phenylalanin) zur Verfügung stehen (SCHNÜLL, 1983; GIFFEY, 1997). Vorhandene Enterokokkenstämme könnten dann ihre Fähigkeit zur Bildung von Phenylethylamin ausschöpfen.

Die eigene Arbeit macht somit das Potenzial der verschiedenen Enterokokkenspezies Phenylethylamin bilden zu können, deutlich. Sie haben dadurch ihre Bedeutung als potenzielle Auslöser von Lebensmittelintoxikationen, nicht nur im Sinne von direkten Krankheitserregern.

In der Lebensmittelindustrie finden Enterokokken häufig als Starterkulturen zur pH-Wertverschiebung, Stabilisierung und Aromabildung Verwendung. Dazu werden hauptsächlich Vertreter der Spezies *Ec. faecium* und *Ec. durans*, seltener *Ec. faecalis*, ausgewählt (BEUTLING, 1994). Häufig sind Enterokokken aber auch aufgrund ihres Vorkommens im Ausgangsmaterial im fertigen Lebensmittel anzutreffen, wenn sie durch Verunreinigungen ins Rohmaterial gelangen. So sind Enterokokken zum Beispiel gewöhnlich in Rohmilch und Rohmilchprodukten nachzuweisen (GARG u. MITAL, 1991; GIRAFFA et al., 1995). Milch ist ein ideales Substrat für diese Bakteriengattung. Man findet sie u.a. in einer großen Zahl von Milchprodukten und Käse aber auch in Rohschinken, Rohwurst, Kochschinken und verschiedenen Brühwurstherzeugnissen. In fermentierten Lebensmitteln sind sie an der Proteolyse und an der Aromabildung im Sinne der Reifung beteiligt. In ausgereiften Produkten können

Keimzahlen bis zu 10^7 KbE/g nachgewiesen werden (SINELL,1978; SUZZI et al., 2000; BOVER-CID et al., 2001a).

Einen Überblick über die in den eigenen Untersuchungen verwendeten Lebensmittel zur Isolierung der Enterokokken, welche dann auf ihr Vermögen Phenylethylamin und Tyramin zu bilden untersucht worden sind, gibt Tabelle 35.

Einzelne Vertreter der hier untersuchten verschiedenen Enterokokkenspezies könnten soviel Phenylethylamin bilden, dass ausgehend von der oben genannten Größenordnung von 10^7 KbE Enterokokken/g Lebensmittel und der toxischen Dosis für Phenylethylamin von 3-5 mg, der Verzehr von wenigen Gramm eines solchen Lebensmittels bei empfindlichen Personen ausreicht, um zu klinischen Symptomen zu führen. Der Stamm H 005 der *Ec. hirae* Stämme zeigte unter allen untersuchten Enterokokkenstämmen das größte Potenzial zur Phenylethylaminbildung. Theoretisch würde unter idealen Entwicklungs- und Decarboxylasebedingungen für diesen Stamm der Konsum von 6 g eines kontaminierten Lebensmittels ausreichen, um bei sensitiven Personen Symptome einer Intoxikation hervorzurufen.

Aus der Gruppe der *Ec. durans* Stämme stellte sich der Stamm D 203 als derjenige mit der größten Phenylethylaminbildungskapazität dar. Bei diesem Stamm würden theoretisch 15 g eines kontaminierten Lebensmittels zum Hervorrufen von Symptomen ausreichen.

**Tab. 35: Phenylethylaminbildung durch Enterokokkenstämme aus
Lebensmitteln nach 72 Stunden Bebrütung bei 30 °C**

	Stamm	PEA mg/ml	pH
Schweineschlacht- körper	Fs 015	0,93	4,25
	Fs 020	0,93	4,25
	H 001	1,69	4,43
	H 002	1,52	4,45
	H 004	1,52	4,46
	H 005	1,73	4,42
Rinderschlacht- körper	Fs 106	1,09	4,52
	D 102	1,05	4,22
Schweinehack- fleisch	Fc 302	0,51	4,31
	Fc 304	Spuren	4,61
	D 303	Spuren	4,11
Käse	Fs 202	1,05	4,52
	Fs 205	0,82	4,20
	Fs 209	0,24	4,03
	D 203	1,37	5,57
	D 201	n.a.	4,12
	D 202	n.a.	4,10
	D 303	Spuren	4,11
	G 201	n.a.	4,09
	G 202	n.a.	4,14
Huhn	Fc 403	0,26	4,23
	H 402	0,94	4,17

Stammbezeichnung: Fs *Ec. faecalis*
Fc *Ec. faecium*
D *Ec. durans*
H *Ec. hirae*
G *Ec. gallinarum*
C *Ec. casseliflavus*

n.a. keine Aminbildung nachgewiesen

Spuren Bildung unterhalb der Bestimmungsgrenze der Methode

Bei den untersuchten Stämmen der Spezies *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* waren die Stämme Fc 302 und Fs 202 diejenigen mit dem größten Phenylethylaminbildungsvermögen. Hier würde unter oben genannten theoretischen Bedingungen der Verzehr von 30 bzw. 60 g des mit dem jeweiligen Stamm besetzten Lebensmittels zu klinischen Symptomen führen. Nicht geklärt ist dabei, ob es sich bei den Enterokokken isoliert aus Käse um Starterkulturen oder Kontaminanten durch Verunreinigung handelt. Interessant

wäre die Klärung dieser Frage vor allem bei den *Ec. faecalis* Stämmen Fs 202, Fs 205 und bei dem *Ec. durans* Stamm D 203. Diese Stämme bildeten unter gegebenen Untersuchungsbedingungen ca. 1 mg Phenylethylamin je ml Bouillon und gehören damit zu den starken Aminbildnern der geprüften Enterokokkenstämme.

Oben genannte Ausführungen sind zwar nur theoretische Überlegungen, sie zeigen jedoch die Möglichkeiten und Potenziale von Enterokokken unter ungünstigen Bedingungen in der Praxis schnell die Menge an Phenylethylamin bilden zu können, welche die Grenze der toxischen Dosis erreicht.

Die in den eigenen Untersuchungen geprüften Enterokokken können aufgrund ihrer Gefährlichkeit hinsichtlich Aminbildung (PEA) wie folgt eingeordnet werden: *Ec. hirae* -> *Ec. faecalis* -> *Ec. durans* -> *Ec. faecium*. Dabei ist zu beachten, dass ein Vertreter der Spezies *Ec. durans* mehr Phenylethylamin bilden konnte als die *Ec. faecalis* Stämme. Jedoch wurde hier bei allen Vertretern dieser Stammgruppe Phenylethylaminbildung nachgewiesen. Bei der Spezies *Ec. durans* waren nur zwei von fünf untersuchten Stämmen in der Lage dieses Amin zu bilden. Die oben genannte Einstufung zeigt die darmbewohnenden Enterokokken als die kräftigsten Aminbildner. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die Bildung von Phenylethylamin und Tyramin evtl. als Überlebensstrategie der Enterokokken innerhalb der Konkurrenz der Darmflora zu bewerten ist (Hemmung des Wachstums anderer Keime, GIFFEY u. BEUTLING, 2000). Diese Eigenschaft scheint einen weiteren Pathogenitätsfaktor der Enterokokken darzustellen.

Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit nach folgenden Forderungen:

- die Überprüfung eingesetzter Starterkulturen auf ihre Fähigkeit biogene Amine einschließlich Phenylethylamin zu bilden,
- dem Einsatz von qualitativ hochwertigem Rohmaterial,
- einer entsprechenden Hygiene im Herstellungsprozeß sowie
- niedrige Temperaturen bei der Lagerung des fertigen Lebensmittels.

Im Schrifttum gibt es mittlerweile einige Arbeiten, die sich mit dieser Problematik auseinandersetzen. Folgende Autoren unterstützen mit ihren Untersuchungen einzelne oder mehrere der oben genannten Forderungen:

EDWARDS u. SANDINE, 1981; HALÁSZ et al., 1994; GIRAFFA et al., 1995, 1997; SANTOS, 1996; HERNÁNDEZ-JOVER et al. 1997; BOVER-CID u. HOLZAPFEL, 1999; HALÁSZ et al., 1999; PETÄJÄ et al., 2000; SCHEUER u. RÖDEL, 2000; BOVER-CID et. al., 2000, 2000a, 2000b, 2001; KOMPRDA et al., 2001; BEUTLING et al., 2001; BEUTLING u. WALTER, 2002.

Ziel lebensmittelhygienischer Bemühungen muß es sein, die Zahl der aminproduzierenden Enterokokken im Lebensmittel möglichst gering zu halten und damit die Gefahr von Lebensmittelintoxikationen durch biogene Amine zu minimieren.

In den eigenen Untersuchungen wurde der *Ec. faecium* Stamm Fc 304 als phenylethylaminnegativer Stamm identifiziert. Unter den *Ec. durans* Stämmen konnten drei von fünf der untersuchten Stämme weder Phenylethylamin, noch Tyramin bilden. Die genannten Stämme zeigten gute Säuerung und Keimvermehrung. Diese Ergebnisse zeigen, dass es Stämme dieser Spezies gibt, die die Fähigkeit zur Phenylethylamin- und Tyraminbildung mit großer Wahrscheinlichkeit nicht besitzen und somit als potenzielle Starterkulturen geeignet wären. Im Schrifttum findet man keine Angaben zu Untersuchungen von Enterokokken dieser Speziesgruppen, die Stämme herausstellen, welche weder Phenylethylamin- noch Tyraminbildung aufweisen.

Zu berücksichtigen ist, dass in den eigenen Untersuchungen nur jeweils drei *Ec. faecium* und fünf *Ec. durans* Stämme auf ihr Vermögen zur Phenylethylamin- und Tyraminbildung untersucht worden sind. Ziel weiterführender Untersuchungen sollte es sein, durch Prüfen mehrerer *Ec. faecium* und *Ec. durans* Stämme, d.h. Erhöhung der Untersuchungszahlen sowie Überprüfung weiterer Enterokokkenspezies, mehr Stämme als phenylethylamin- und tyraminnegative Enterokokkenstämme zu identifizieren. Diese wären bei entsprechender Säuerung und guter Keimvermehrung als potenzielle Starterkulturen geeignet. Als weitere Voraussetzung solcher Stämme ist zu beachten, dass sie die Fähigkeit Histamin zu bilden nicht besitzen. Da in der Literatur kaum Enterokokkenstämme beschrieben sind, die dazu in der Lage wären, bzw. die gebildete Histaminmenge durch Enterokokken keine Relevanz im Hinblick auf toxikologische Sicht hatte (THAM, 1988), blieb

die Untersuchung der Enterokokken auf diese Eigenschaft in der eigenen Arbeit unberücksichtigt.

Darüber hinaus sei auf einen Beitrag von BÜLOW-OLSEN (2001) hingewiesen. Die Autorin engagiert sich in der Dänischen Migräne-Gesellschaft und brachte einige Wünsche ihrer Patienten in Hinsicht auf die weitere Erforschung der biogenen Amine Tyramin und Phenylethylamin an die Öffentlichkeit. Unter anderem forderte sie das Herausfinden solcher Bakterienstämme, welche Tyramin und Phenylethylamin bilden können, Schnellmethoden für Labore, maximale Amingehalte erkennen zu können und die Entwicklung von Bakterienkulturen zum Einsatz in der Lebensmittelindustrie, die weder Phenylethylamin noch Tyramin erzeugen können.

In diesem Zusammenhang sei auf die Wichtigkeit weiterführender Forschungen hingewiesen, wie sie z.B. im Rahmen eines EU-Projektes „Enterococci in food fermentations: Functional and safety aspects“ (FAIR-CT 3078) durchgeführt werden. In diesem Projekt soll unter anderem die taxonomische Verwandtschaft von Enterokokkenisolaten aus Lebensmitteln, Tieren und Menschen untersucht werden, die Eignung der Enterokokken als Starterkulturen hinsichtlich ihrer probiotischen Eigenschaften herausgefunden werden sowie deren Prüfung auf Sicherheitsaspekte in Bezug auf die Ausprägung von Virulenzfaktoren erfolgen. Leider wird in bisherigen Veröffentlichungen aus diesem Untersuchungsprogramm die Bildung biogener Amine durch Enterokokken nur wenig berücksichtigt.

Die Methode der HPLC zur Aminanalyse

Die hier durchgeführte Methode der HPLC zur Bestimmung von Phenylethylamin und Tyramin stellte sich als sehr gut geeignet heraus. Die Untersuchungsmethode wies eine große Genauigkeit auf (siehe Kap. 3.3.6.). SHAKILA et al. (2001) verglichen in einer Arbeit die Dünnschichtchromatographie mit der Methode der HPLC zur Bestimmung von biogenen Aminen. Als Derivatisierungsreagenz verwendeten die Autoren Dansylchlorid. Sie wiesen die biogenen Amine in Größenordnungen von 5-10 ng mittels HPLC

nach, während mit der Methode der Dünnschichtchromatographie nur Mengen von 15 bis 20 ng bestimmt werden konnten. Auch sie stellten damit die niedrige Nachweisgrenze und die hohe Genauigkeit als Vorteile der HPLC heraus. Dem gegenüber stehen ein hoher Aufwand an Technik, Zeit und Kosten. Mit der verwendeten Methode der HPLC (Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd) in den eigenen Untersuchungen konnten ebenfalls Bereiche bis ca. 5 ng Phenylethylamin bzw. Tyramin bestimmt werden.

BOVER-CID und HOLZAPFEL (1999) verwendeten die HPLC als Kontrollmethode zum Nachweis von biogenen Aminen bei der Entwicklung eines Schnellverfahrens zum Testen von Milchsäurebakterien auf ihr Aminbildungsvermögen. In der Literatur gibt es weitere Autoren, die in ihren Untersuchungen die Methode der HPLC zum Nachweis von biogenen Aminen, auch speziell Phenylethylamin gewählt haben: Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd: JUHLS et al. (1999), BEUTLING et al. (2001), BEUTLING u. WALTER (2002); Nachsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd: BOVER-CID et al. (1999, 2000a, 2000b, 2001, 2001a).