

Institut für Ernährungswissenschaft
Professur für Lebensmittelwissenschaften
Justus-Liebig-Universität Gießen

Analytik von Aminosäuren und biogenen Aminen in fermentierten Lebensmitteln mittels HPLC und GC

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich 19 Ernährungs- und Haushaltswissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Dipl. oec. troph. In-Girl Baek
aus Seoul / Korea

Gießen 1999

für meine Eltern, Jong-Mi, Dong-Cheol und Dong-Hyuk

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung und Vorkommen von D-Aminosäuren	1
1.1.1	Bedeutung von D-Aminosäuren in Lebensmitteln	2
1.1.2	Chromatographische Methoden zur Bestimmung von D- und L-Aminosäuren	3
1.1.2.1	Überblick	3
1.1.2.2	Gaschromatographie (GC)	4
1.1.2.3	Flüssigchromatographie	5
1.1.2.3.1	Methoden der achiralen flüssigchromatographischen Aminosäureanalytik	5
1.1.2.3.2	Methoden der chiralen flüssigchromatographischen Aminosäureanalytik	6
1.2	Bedeutung und Vorkommen von Biogenen Aminen	8
1.2.1	Entstehung biogener Amine in Lebensmittel	10
1.2.2	Bildung von biogenen Aminen durch Mikroorganismen	12
1.2.3	Biogene Amine als Kriterium zur Qualitätsbeurteilung in Lebensmitteln	13
1.3	Asiatisch fermentierte Lebensmittel ("Oriental" oder "Asian" Fermented Food)	15
1.3.1	Koji	16
1.3.2	Sojasaucen	16
1.3.2.1	Fermentierte Sojasaucen	17
1.3.2.2	Gemischte Sojasaucen	17
1.3.3	Miso und Pepperonipasten	18
1.4	Aufgabenstellung	20

2	MATERIAL	21
2.1	Instrumentelle Anordnung	21
2.1.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	21
2.1.2	Gaschromatographie (GC)	23
2.1.3	Weitere Geräte und Hilfsmittel	23
2.2	Chemikalien und Reagenzien	24
2.2.1	Aminosäuren	24
2.2.2	Biogene Amine	24
2.2.3	Chemikalien zur Probenaufarbeitung und Derivatisierung	25
2.2.4	Gase aus Druckgasflaschen für HPLC und GC	26
2.3	Herstellung von Lösungen und Reagenzien	27
2.3.1	OPA/MPA-FMOC-CI-Methode	27
2.3.1.1	Aminosäurestammlösungen und Standardgemische	27
2.3.1.2	Reagenzien für OPA/MPA-FMOC-CI-Derivate	27
2.3.1.3	Eluenten für OPA/MPA-FMOC-CI-Derivate	28
2.3.2	OPA/IBL(D)C-Methode	28
2.3.2.1	Aminosäurestammlösungen und Standardgemische	28
2.3.2.2	Reagenzien für OPA/IBL(D)C-Derivate	29
2.3.2.3	Eluenten für OPA/IBL(D)C-Derivate	29
2.3.3	PNZ-CI-Methode	30
2.3.3.1	Stammlösungen und Standardgemische der BA	30
2.3.3.2	Reagenzien für PNZ-CI-Derivate	31
2.3.3.3	Eluenten für PNZ-CI-Derivate	31
2.3.4	Herstellung von Lösungen und Reagenzien für GC	32
2.3.4.1	Aminosäuren-Standardgemisch	32
2.3.4.2	Reagenzien für PFPA-Derivate	32
2.3.4.3	Mobile Phase für GC	32

2.4	Herkunft der Probenmaterialien	32
2.4.1	Sojabohnen und Sojabohnenkoji	32
2.4.2	Sojasaucen	33
2.4.3	Miso	34
2.4.4	Pepperonipasten	35
2.4.5	Sake	36
2.4.6	Fischsaucen	36
2.5	Aufarbeitung der Proben zur Analyse mittels HPLC und GC	37
2.5.1	Aufarbeitung zur Analyse der Aminosäuren mittels HPLC	37
2.5.1.1	Fettfreie Proben: Sojasaucen, Sake	37
2.5.1.2	Fetthaltige Proben: Sojabohnen, Sojabohnenkoji, Miso, Pepperonipasten, Fischsaucen	37
2.5.2	Aufarbeitung der Proben zur Analyse mittels GC	40
2.5.3	Isolierung von freien Aminosäuren mittels Ionenaustauschchromatographie	40
2.5.4	Aufarbeitung der Proben zur Analyse der biogenen Amine mittels HPLC	41
3	OPTIMIERUNG DER HPLC- UND GC-METHODEN	42
3.1	Vorsäulenderivatisierung mit OPA zur achiralen und chiralen Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC	42
3.2	Achirale OPA/MPA-FMOC-CI-Methode mittels HPLC	45
3.2.1	Optimierung der chromatographischen Trennung	45
3.2.1.1	Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren	45
3.2.1.2	Chromatographische Trennung	47
3.2.1.3	Detektion der Aminosäuren	48
3.2.2	Quantifizierung der Aminosäuren	49
3.2.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	49
3.3	Chirale OPA/IBL(D)C-Methode	50

3.3.1	HP 1090 L System	51
3.3.1.1	Optimierung der chromatographischen Trennungen	51
3.3.1.1.1	Vollautomatisierte Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren	51
3.3.1.1.2	Chromatographische Trennung	51
3.3.1.1.3	Detektion der Aminosäuren	54
3.3.1.2	Quantifizierung der Aminosäuren	54
3.3.1.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	54
3.3.2	LaChrom System	56
3.3.2.1	Optimierung der chromatographischen Bedingungen	56
3.3.2.1.1	Vollautomatisierte Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren	56
3.3.2.1.2	Chromatographische Trennung	57
3.3.2.1.3	Detektion der Aminosäuren	59
3.3.2.2	Quantifizierung der Aminosäuren	59
3.3.2.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	59
3.4	<i>para</i> -Nitrobenzyloxycarbonylchlorid zur Bestimmung von biogenen Aminen mittels HPLC	61
3.4.1	Optimierung der chromatographischen Trennungen	61
3.4.1.1	Manuelle Vorsäulenderivatisierung der biogenen Amine	61
3.4.1.2	Chromatographische Trennungen der biogenen Amine	62
3.4.1.3	Detektion der biogenen Amine	65
3.4.2	Quantifizierung der biogenen Amine	65
3.4.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	65
3.5	GC-Methode	66
3.5.1	Eigenschaften der Trennphase und Derivatisierung für die Analyse mittels GC/MS	66
3.5.1.1	Veresterung der Carboxylgruppe	66
3.5.1.2	Acylierung der Aminogruppe	67
3.5.2	Trennung der Aminosäure-Derivate	68
3.5.3	Quantifizierung der Aminosäurederivate	71

3.5.3.1	Ermittlung der Responsefaktoren (f_R)	71
3.5.3.2	Berechnung der AS-Konzentration	72
4	ERGEBNISSE	73
4.1	Achirale Aminosäureanalytik	73
4.1.1	Sojabohnen und Sojabohnenkoji (Rohstoffe)	73
4.1.2	Sojasaucen	76
4.1.2.1	Fermentierte Sojasaucen	76
4.1.2.2	Gemischte Sojasaucen	78
4.1.3	Miso	81
4.1.4	Pepperonipasten	85
4.1.5	Sake	89
4.1.6	Fischsaucen	91
4.2	Chirale Aminosäureanalytik	93
4.2.1	Sojabohnen und Sojabohnenkoji (Rohstoffe)	93
4.2.2	Sojasaucen	95
4.2.2.1	D-Aminosäuren in fermentierten Sojasaucen	95
4.2.2.2	D-Aminosäuren in gemischten Sojasaucen	97
4.2.3	D-Aminosäuren in Miso	99
4.2.4	D-Aminosäuren in Pepperonipasten	102
4.2.5	D-Aminosäuren in Sake	104
4.2.6	D-Aminosäuren in Fischsaucen	105
4.3	Analytik biogener Amine	107
4.3.1	Sojabohnen und Sojabohnenkoji (Rohstoffe)	107
4.3.2	Biogene Amine in Sojasaucen	109
4.3.3	Biogene Amine in Miso	111
4.3.4	Biogene Amine in Pepperonipasten	113
4.3.5	Biogene Amine in Sake	115
4.3.6	Biogene Amine in Fischsaucen	116

5	DISKUSSION	119
5.1	Rohmaterialien zur Herstellung der fermentierten Sojapro- dukten	119
5.1.1	Achirale Analytik der Aminosäuren in Rohmaterialien	119
5.1.2	Chirale Analytik der Aminosäuren in Rohmaterialien	120
5.1.3	Biogene Amine in Rohmaterialien	121
5.2	Fermentierte Sojaprodukte	121
5.2.1	Sojasaucen	121
5.2.1.1	Achirale Analytik der Aminosäuren in Sojasaucen	122
5.2.1.2	Chirale Analytik der Aminosäuren in Sojasaucen	124
5.2.1.2.1	Fermentierte Sojasaucen	124
5.2.1.2.2	Gemischte Sojasaucen	127
5.2.1.3	Biogene Amine in Sojasaucen	131
5.2.2	Miso	132
5.2.2.1	Achirale Analytik der Aminosäuren in Miso	132
5.2.2.2	Chirale Analytik der Aminosäuren in Miso	135
5.2.2.3	Biogene Amine in Miso	136
5.2.3	Pepperonipasten	136
5.2.3.1	Achirale Analytik der Aminosäuren in Pepperonipasten	137
5.2.3.2	Chirale Analytik der Aminosäuren in Pepperonipasten	138
5.2.3.3	Biogene Amine in Pepperonipasten	139
5.2.4	Sake	140
5.2.4.1	Achirale Analytik der Aminosäuren in Sake	140
5.2.4.2	Chirale Analytik der Aminosäuren in Sake	140
5.2.4.3	Biogene Amine in Sake	141
5.2.5	Fischsaucen	141
5.2.5.1	Achirale Analytik der Aminosäuren in Fischsaucen	141

5.2.5.2	Chirale Analytik der Aminosäuren in Fischsaucen	142
5.2.5.3	Biogene Amine in Fischsaucen	142
5.2.6	Diskussion der Methoden	143
5.2.6.1	Gesamttrennung	143
5.2.6.2	Problematik bei der Trennung einzelner D/L-AS	144
5.2.6.3	Derivatisierungsvorgang	145
5.2.6.4	Bestimmungsgrenzen	146
6	ZUSAMMENFASSUNG	147
7	LITERATURVERZEICHNIS	151
8	ANHANG	168

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1	Chemische Strukturen aliphatischer Amine	9
Abb. 1-2	Chemische Strukturen aromatischer und heterocyclischer Amine	10
Abb. 1-3	Zusammenhänge der Bildungswege der Polyamine	12
Abb. 1-4	Herstellungsprozeß von fermentierten Sojaprodukten	19
Abb. 2-1	Schema der Aufarbeitung der fettfreien Proben	38
Abb. 2-2	Schema der Aufarbeitung der fetthaltigen Proben	39
Abb. 3-1	Reaktionsschema der primären AS mit OPA in Gegenwart von achiralen und chiralen Thiolverbindungen	42
Abb. 3-2	Reaktionsschema der AS mit FMOC-Cl zur Erfassung von sekundären AS (am Beispiel Pro)	44
Abb. 3-3	Schema der Derivatisierung der AS mit OPA/MPA-FMOC-Cl nach SPENGLER unter Verwendung eines programmierbaren Autosamplers	46
Abb. 3-4	HPLC-Chromatogramm eines Standards (10 µM) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl	47
Abb. 3-5	HPLC-Chromatogramm von Standards (L:D=2:1 bei IBLC, D:L=1:2, Cit 1:1 bei IBDC) nach Derivatisierung mit (a) OPA/IBLC und (b) OPA/IBDC mittels HP 1090 OPA/IBL(D)C unter Verwendung eines programmierbaren Autosamplers	53
Abb. 3-6	Schema der Derivatisierung der AS mit OPA/IBL(D)C unter Verwendung eines programmierbaren Autosamplers	56
Abb. 3-7	HPLC-Chromatogramme von Standards (L:D=2:1, Cit 1:1) nach Derivatisierung mit (a) OPA/IBLC und (b) OPA/IBDC mittels HPLC-System LaChrom	58
Abb. 3-8	Schema der Derivatisierung der Amine mit PNZ-Cl nach KIRSCHBAUM et al.	62

Abb. 3-9	HPLC-Chromatogramm eines Standards (100 μ M) nach Derivatisierung mit PNZ-Cl	63
Abb. 3-10	Veresterung der Aminosäuren am Beispiel von Ala mit 2-Propanol	67
Abb. 3-11	Acylierung der Aminosäure-2-Propylester am Beispiel von Ala-2-propylester mit PFPAA	67
Abb. 3-12	GC-Chromatogramm eines Standards (L:D=2:1) nach Derivatisierung mit PFPAA	68
Abb. 4-1	HPLC-Chromatogramme von (a) Sojabohnen und (b) Sojabohnenkoji nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl	75
Abb. 4-2	HPLC-Chromatogramm einer fermentierten Sojasauceprobe (A1) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl	78
Abb. 4-3	HPLC-Chromatogramm einer gemischten Sojasauceprobe (B4) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl	80
Abb. 4-4	HPLC-Chromatogramme von (a) einer Sojabohnenmiso A4 und (b) einer Weizenmiso B2 nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl	84
Abb. 4-5	HPLC-Chromatogramme von (a) einer Reispfefferonipasten A2 und (b) einer Weizenpfefferonipasten B2 nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl	88
Abb. 4-6	HPLC-Chromatogramm einer Sakeprobe (A1) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl	89
Abb. 4-7	HPLC-Chromatogramm einer Fischsauceprobe (A1) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl	91
Abb. 4-8	HPLC-Chromatogramm von Sojabohnen nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System HP 1090 L	94
Abb. 4-9	HPLC-Chromatogramm von Sojabohnenkoji nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System HP 1090 L	95
Abb. 4-10	HPLC-Chromatogramm einer fermentierten Sojasauceprobe (A6) nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	97
Abb. 4-11	HPLC-Chromatogramm einer gemischten Sojasauce (B4) nach	99

	Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	
Abb. 4-12	HPLC-Chromatogramme der Misoproben (a) A3 und (b) B4 nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	101
	Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	
Abb. 4-13	HPLC-Chromatogramme der Pepperonipasten (a) A1 und (b) B1 nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	103
	Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	
Abb. 4-14	HPLC-Chromatogramm einer 5 Jahre alten Sakeprobe (A3) nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	105
	Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	
Abb. 4-15	HPLC-Chromatogramm einer Fischsauce (A1) nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	106
	Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom	
Abb. 4-16	HPLC-Chromatogramme von (a) Sojabohnen und (b) Sojabohnenkoi nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	108
	Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	
Abb. 4-17	HPLC-Chromatogramme der (a) fermentierten Sojasauceprobe A2 und der (b) gemischten Sojasauceprobe B4 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	110
	Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	
Abb. 4-18	HPLC-Chromatogramme der Misoproben (a) A1 und (b) B2 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	112
	Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	
Abb. 4-19	HPLC-Chromatogramme der Pepperonipasten (a) A1 und (b) B2 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	114
	Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	
Abb. 4-20	HPLC-Chromatogramme einer Sakeprobe A1 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	116
	Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	
Abb. 4-21	HPLC-Chromatogramme einer Fischsauceprobe A1 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	118
	Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl	
Abb. 5-1	Relativer Gehalt von Arg, Cit und Orn am Gesamtgehalt in fermentierten und gemischten Sojasaucen	123
Abb. 5-2	Verhältnis zwischen D-Ala und D-Asp in fermentierten und gemischten Sojasaucen	130
Abb. 5-3	Relativer Gehalt von Arg, Cit und Orn am Gesamtgehalt in Miso	134

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1-1	Auswahl an durch Decarboxylierung von Aminosäuren entstehenden biogenen Aminen	11
Tab. 2-1	Probenbezeichnungen und Charakteristika der Sojasaucen	33
Tab. 2-2	Probenbezeichnungen und Charakteristika von Miso	34
Tab. 2-3	Probenbezeichnungen und Charakteristika von Pepperonipasten	35
Tab. 2-4	Probenbezeichnungen und Charakteristika der Sake	36
Tab. 2-5	Probenbezeichnungen und Charakteristika von Fischsaucen	36
Tab. 3-1	Gradientenprogramm zur Trennung der OPA/MPA-FMOC-Derivate der Aminosäuren auf einer NovaPak C ₁₈ RP-Säule (300 mm x 3,9 mm I.D., Waters). Eluent A: Natriumacetat (0,1 M, pH 6,5) mit Zusatz von TEA (0,044 %, v/v), Eluent B: MeCN (100 %)	48
Tab. 3-2	Detektionsprogramm des FLD für die OPA/MPA- und die FMOC-Cl-Derivate innerhalb einer Trennung	49
Tab. 3-3	Nachweisgrenzen (NG) der einzelnen AS für die Analyse mittels OPA/MPA-FMOC-Cl	50
Tab. 3-4	Gradientenprogramm zur Trennung der OPA/IBL(D)C-Derivate der Aminosäuren auf einer Hypersil ODS2-Säule (250 mm x 4 mm I.D. Hewlett-Packard). Eluent A: Natriumacetat (23 mM, pH 6,05), Eluent B: MeOH/MeCN (12/1, v/v).	52
Tab. 3-5	Nachweisgrenze (NG) der einzelnen AS für die Analyse mittels OPA/IBLC bzw. OPA/IBDC bei System HP 1090	55
Tab. 3-6	Gradientenprogramm zur Trennung der OPA-IBL(D)C-Derivate der Aminosäuren auf einer NovaPak C ₁₈ Säule (300 mm x 3,9 mm I.D. Waters). Eluent A: Natriumacetat (20 mM, pH 6,15), Eluent B: MeOH/MeCN (12/1, v/v).	57

Tab. 3-7	Nachweisgrenze (NG) der einzelnen AS für die Analyse mittels OPA/IBLC bzw. OPA/IBDC bei LaChrom System	60
Tab. 3-8	Gradientenprogramm zur Trennung der PNZ-Cl-Derivate der biogenen Amine auf einer Superspher 100 RP-18e-Säule (250 mm x 4 mm I.D. Merck). Eluent A und C: Natriumacetat (beide 100 mM, pH 6,1 bzw. pH 4,3), Eluent B: MeCN (100 %)	64
Tab.3-9	Nachweisgrenze (NG) der einzelnen BA für die Analyse mittels HPLC nach Derivatisierung mit PNZ-Cl	65
Tab. 3-10	Chromatographische Bedingungen für die Analyse mittels GC/MS	69
Tab. 3-11	Zeitfenster und Massenfragmente für die Bestimmung von Aminosäureenantomeren als <i>N</i> (<i>O</i>)-Pentafluor-propionyl-2-Propylester	70
Tab. 3-12	Responsefaktoren (f_R) der Aminosäuren ($n=3$)	71
Tab. 4-1	Absolutgehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der bestimmbaren AS [%] in Sojabohnen und Sojabohnenkoji, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl ($n=2$)	74
Tab. 4-2	Absoluter [g/l] Gehalt an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in fermentierten Sojasaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl ($n=2$)	77
Tab. 4-3	Absoluter Gehalt [g/l] an Aminosäuren und relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in gemischten Sojasaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl ($n=2$)	79
Tab. 4-4	Absoluter Gehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in Misoproben der Serie A, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl ($n=2$)	82
Tab. 4-5	Absoluter Gehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil	83

	der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in Misoproben der Serie B, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2)	
Tab. 4-6	Absolutgehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt [%] in Pepperonipasten der Serie A, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2)	86
Tab. 4-7	Absolutgehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt [%] in Pepperonipasten der Serie B, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2)	87
Tab. 4-8	Absoluter Gehalt [mg/l] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in Sake, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2)	90
Tab. 4-9	Absoluter Gehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in Fischsaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2)	92
Tab. 4-10	Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in Sojabohnen und Koji, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]	94
Tab. 4-11	Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in fermentierten Sojasaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]	96
Tab. 4-12	Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in gemischten Sojasaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]	98
Tab. 4-13	Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in Miso, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]	100
Tab. 4-14	Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in Pepperonipasten, er-	102

	mittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]	
Tab. 4-15	Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in Sake, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]	104
Tab. 4-16	Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in Fischsaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]	106
Tab. 4-17	Absolutgehalt [mg/kg] an biogenen Aminen in Rohstoffen (Sojabohnen und Sojabohnenkoji), ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2)	107
Tab. 4-18	Absolutgehalt [mg/l] an biogenen Aminen in Sojasaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2)	109
Tab. 4-19	Absolutgehalt [mg/kg] an biogenen Aminen in Miso, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2)	111
Tab. 4-20	Absolutgehalt [mg/kg] an biogenen Aminen in Pepperonipasten, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2)	113
Tab. 4-21	Absolutgehalt [mg/l] an biogenen Aminen in Sake, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2)	115
Tab. 4-22	Absolutgehalt [mg/kg] an biogenen Aminen in Fischsaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2)	117
Tab. 8-1	Einzelschritte des Autosamplerprogramms zur Derivatisierung der Aminosäuren mit Kurzbeschreibung der ausgeführten Schritte für OPA/MPA-FMOC-Cl-Methode	168
Tab. 8-2	Einzelschritte des Autosamplerprogramms zur Derivatisierung der Aminosäuren mit Kurzbeschreibung der ausgeführten Schritte für OPA/IBL(D)C-Methode bei LaChrom -System	172
Tab. 8-3	Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß	174

	der Kalibrierungskurven ($y = \text{Peakflächen } [\mu\text{V}\cdot\text{s}]$, $x = \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$)	
Tab. 8-4	Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß der Kalibrierungskurven für OPA/IBLC bei HP 1090 System ($y = \text{Peakflächen } [\%F\cdot\text{s}]$, $x = \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$)	175
Tab. 8-5	Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß der Kalibrierungskurven für OPA/IBDC bei HP 1090 System ($y = \text{Peakflächen } [\%F\cdot\text{s}]$, $x = \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$)	176
Tab. 8-6	Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß der Kalibrierungskurven für OPA/IBLC bei LaChrom Systeme, ($y = \text{Peakflächen } [\mu\text{V}\cdot\text{s}]$, $x = \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$)	177
Tab. 8-7	Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß der Kalibrierungskurven für OPA/IBDC bei LaChrom Systeme, ($y = \text{Peakflächen } [\mu\text{V}\cdot\text{s}]$, $x = \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$)	179

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Agm	Agmatin
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
BA	Biogene Amine
BAI	Biogene Amine Index
BHT	Butyl-hydroxy-toluol (2,6-Di- <i>tert</i> -butyl- <i>p</i> -kresol)
Asp	Asparaginsäure
Cad	Cadaverin
Cys	Cystein
DAO	Diaminoxidase
DCM	Dichlormethan
Dhx	1,6-Diaminohexan
Em.	Emission (Meßwellenlänge)
Ex.	Excitation (Anregungswellenlänge)
F	Fluoreszenz
FLD	Fluoreszenzdetektor
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FMOC-Cl	9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
Gaba	4-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatograph
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HCl	Salzsäure
Him	Histamin

His	Histidin
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IBC	<i>N</i> -Isobutyryl-Cystein
IBDC	<i>N</i> -Isobutyryl-D-Cystein
IBLC	<i>N</i> -Isobutyryl-L-Cystein
Ile	Isoleucin
ISTD	Interner Standard
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
Leu	Leucin
LM	Lebensmittel
Lys	Lysin
MO	Mikroorganismen
ME	2-Mercaptoethanol
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MPA	3-Mercaptopropionsäure
n.d.	nicht detektiert
Nle	Norleucin
Nva	Norvalin
Ocp	Octopamin
OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
Orn	Ornithin
Phe	Phenylalanin
Pea	β -Phenylethylamin
Pip	Pipecolinsäure
PNZ-Cl	<i>para</i> -Nitrobenzyloxycarbonylchlorid
Pro	Prolin
Put	Putrescin
Sar	Sarcosin
Seo	Serotonin
Ser	Serin
SIM	Selected Ion Monitoring

Spd	Spermidin
Spm	Spermin
STD	Standard
Tab.	Tabelle
Tau	Taurin
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Trm	Tryptamin
Tym	Tyramin
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Vorkommen von D-Aminosäuren

Aminosäuren (AS) stellen die monomeren Bausteine der für lebende Organismen wichtigsten Stoffklassen, der Peptide und Proteine, dar. Es handelt sich um organische Verbindungen, die im Grundgerüst sowohl eine basische Aminogruppe als auch eine saure Carboxylgruppe enthalten. Nach der Stellung der Aminogruppe in der Kohlenstoffkette unterscheidet man zwischen α -, β -, γ -, δ - usw. AS. Besondere Bedeutung haben α -Aminosäuren (α -AS), bei denen Amino- und Carboxylgruppe gemeinsam am C-2 gebunden sind. Beim Abbau von Proteinen werden regelmäßig 20 verschiedene α -AS gefunden, die dementsprechend als proteinogene AS bezeichnet werden [1].

Proteinogene AS, mit Ausnahme des Glycins, besitzen zumindest ein Chiralitätszentrum, welches durch ein asymmetrisch substituiertes C-Atom gebildet wird, so daß zu jeder dieser AS ein zueinander spiegelbildlicher Enantiomer existiert. Enantiomere unterscheiden sich nicht in ihren physikalischen Eigenschaften mit Ausnahme der Drehrichtung linear polarisierten Lichtes, sie werden daher auch optische Isomere oder optische Antipoden genannt [2,3]. Die Konfigurationsbezeichnung der Enantiomeren erfolgt nach der D,L-Nomenklatur von EMIL FISCHER.

Im Verlauf der Evolution hat sich in der Biosphäre eine starke Dominanz der Synthese und Verwendung von L-Aminosäuren (L-AS) gegenüber von D-Aminosäuren (D-AS) herausgebildet [4]. Die bei der ribosomalen Proteinsynthese gebildeten strukturgebenden Proteine, Enzyme und Peptidhormone sind ausschließlich aus L-Aminosäuren aufgebaut. Daher werden die optischen Antipoden der L-AS, die D-Aminosäuren (D-AS), gelegentlich auch als unphysiologische oder nichtproteinogene AS bezeichnet.

Trotz der weitgehenden Etablierung stereoselektiver Prozesse in der belebten Natur zeigt sich innerhalb der proteinogenen AS eine beachtenswerte Verbreitung der D-AS [5-9]. Ihre Synthese kann durch physikalisch-chemische Einflüsse auf die Racemisierung der freien und peptidgebundenen AS bedingt sein [11]. Auch freie L-AS

können von diesen in vielen Bakterien nachgewiesenen Racemasen und Epimerasen umgewandelt werden [12].

Die Entwicklung und Anwendung neuer Analysemethoden zur Trennung von D- und L-AS zeigt jedoch, daß D-AS im Menschen, in Tieren, Pflanzen, Mikroorganismen (MO) sowie in Lebensmitteln (LM) häufiger vorkommen als bislang angenommen wurde. In einer Anzahl höherer Pflanzen, u.a. auch in Leguminosen sowie in Solanaceen, wurden freie D-AS und deren im Verlauf der Metabolisierung durch den pflanzlichen Biochemismus acylierte Derivate gefunden. Weiterhin wurden D-AS in verschiedenen Muschelarten, in Kopffüßlern, in Insekten sowie in Mäusen und Meerschweinchen nachgewiesen [13-17]. Auch in der menschlichen Blutflüssigkeit und im menschlichen Speichel wurden geringe Mengen von D-AS festgestellt [18-22].

Von Bakterien ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß sie einen ausgeprägten D-AS-Stoffwechsel besitzen, der sie zur Biosynthese der D-AS aus den L-AS durch entsprechende Racemasen und Epimerasen befähigt [12]. Die Zellwand aller Eubakterien enthält als Bestandteile des Peptidoglycans D-AS, insbesondere D-Alanin, D-Glutaminsäure und D-Asparaginsäure [23]. Auch im Zellpool von MO wurde eine Vielzahl unterschiedlicher D-AS gefunden, neben den bereits genannten z.B. D-Histidin, D-Leucin, D-Prolin, D-Serin und D-Tyrosin [24-27]. Darüber hinaus sind D-AS in antibiotisch wirksamen Polypeptiden aus der von bestimmten Schimmelpilzen synthetisierten Gruppe der Peptide, sowie in anderen Peptidantibiotika mikrobiellen Ursprungs, wie z.B. Actinomycin, Gramicidin, Bacitracin oder Polymyxin enthalten [28,29]. Diese werden im Gegensatz zur ribosomalen Proteinbiosynthese durch Multienzymkomplexe synthetisiert [30,31], wobei die Position und Konfiguration jeder eingebauten AS einen entscheidenden Einfluß auf die Sekundärstruktur und als unmittelbare Folge hiervon auf die biologische Wirksamkeit der jeweiligen Substanz hat.

1.1.1 Bedeutung von D-Aminosäuren in Lebensmitteln

Viele protein- und aminosäurehaltige LM werden bei ihrer Herstellung, technologischen Bearbeitung oder Zubereitung häufig einer Behandlung mit Säuren [32,33],

Laugen [34] und Hitze [35] unterzogen, was zu einer mehr oder weniger starken Epimerisierung führen kann, die durch Gegenwart von Metallionen zusätzlich katalysiert werden kann [36]. In Lebensmitteln, die einem oder mehreren der beschriebenen Behandlungsschritte unterworfen wurden, können daher in unterschiedlichem Umfang proteingebundene und freie D-AS gefunden werden [37,38].

D-AS sind in fermentierten LM durch zur Herstellung eingesetzten MO weit verbreitet. Durch das Einwirken mikrobieller Enzyme (Racemasen) werden freie L-AS teilweise in ihre optischen Antipoden umgewandelt. Zusätzlich werden durch Autolyse von Bakterien D-AS aus deren Peptidoglycan freigesetzt, so daß D-AS als mikrobielle Stoffwechselprodukte in diesen LM in relativ hohen Mengen auftreten [27,39].

Aus diesem Grunde wurde von BRÜCKNER et al. [40-42] vorgeschlagen, daß D-AS als Indikatoren für die mikrobielle Fermentation und weiterhin zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle für fermentierten LM verwendet werden können. Diskutiert wird auch eine mögliche Korrelation zwischen D-AS-Gehalt und dem Reifegrad von fermentierten LM, was für die Steuerung von Prozeßabläufen bei der industriellen, technologischen Herstellung von LM von Bedeutung sein könnte.

Desweiteren interessiert der Anteil D-AS als charakterisierender Parameter für den Grad einer technologischen Überbehandlung von LM. Auch an den Nachweis von Verfälschungen bei der Herstellung von bestimmten LM ist hier zudenken [43]. Beispielsweise sollte über eine Gehaltsbestimmung von D-AS auf eine Verfälschung von Fruchtsaft durch Zugabe von AS in Form der Racemate geschlossen werden können [44,45].

1.1.2 Chromatographische Methoden zur Bestimmung von D- und L-Aminosäuren

1.1.2.1 Überblick

Die als klassische Methode geltenden Analyseverfahren sind die Polarimetrie, die enzymatische Umsetzung sowie die Trennung von durch Derivatisierung gebildeten Dipeptiden mittels Ionenaustauschchromatographie. Bei der Polarimetrie werden

wegen der unterschiedlichen optischen Aktivität der D- und L-AS sowohl die optische Reinheit eines Aminosäureenantiomeren als auch der Anteil beider optischer Antipoden einer AS in einer Mischung durch die Messung des Drehwinkels von linear polarisiertem Licht ermittelt. Das Verfahren ist jedoch auf die Messung in Reinsubstanz beschränkt und nicht für Bestimmung in komplex zusammengesetzten Probenmatrices geeignet [46]. Durch die Behandlung mit D- und L-Aminosäureoxidasen (AO) lassen sich die Enantiomeren von AS enzymatisch bestimmen [47-50]. Aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität der AO werden mit dieser Methode nur bestimmte AS quantifiziert. Eine weitere klassische chromatographische Methode stellt die Trennung von diastereomeren Dipeptiden mittels der Ionenaustauschchromatographie nach Umsetzung der D- und L-AS mit L-Aminosäurecarboxyanhydriden dar [51]. Aufgrund der umfangreichen Bedeutung der AS ist eine schnelle und empfindliche Methode erforderlich. Die erforderliche hohe Trennleistung, verbunden mit einer hohen Nachweisempfindlichkeit und einer möglichst weitreichenden Automatisierbarkeit der Analyse, bieten zur Zeit vor allem die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Gaschromatographie (GC) [52,53]. Bei den chromatographischen Methoden zur Enantiomerentrennung bestehen zwei Möglichkeiten, zum einen die direkte Enantiomerentrennung an chiralen stationären Phasen, zum anderen die indirekte Diastereomerentrennung nach Derivatisierung mit chiralen Reagenzien an konventionellen achiralen Phasen.

1.1.2.2 Gaschromatographie (GC)

In der GC-Analytik von AS dominieren im Gegensatz zur HPLC die direkten Verfahren zur Enantiomerentrennung, d.h. die Bestimmung der AS-Enantiomeren an chiralen Phasen. GIL-AV et al. [54] stellten eine chirale Trifluoracetyl-L-leucinaurylester-Phase vor, mit deren Hilfe einige AS-Racemate gaschromatographisch in ihre optischen Antipoden aufgetrennt werden konnten. Im Verlauf der folgenden Entwicklung im Bereich der Trennung von D- und L-AS waren Phasen mit *N*-substituierten AS wie z.B. L-Valin (L-Val) als Selektor [55-57], solche mit L-Phenylalanin (L-Phe) [58] oder auch Phasen vom Dipeptidester-Typ, mit L-Val und L-Leucin (L-Leu) [59] erfolgreich. Gerade der Einbau von AS in diesen Phase hat

den großen Vorteil, daß durch Wechsel der Konfiguration dieser Selektor-AS eine Elutionsumkehr bei den Analyt-Enantiomeren stattfindet, was der Sicherheit des Analysenergebnisses zugute kommt. Die von FRANK et al. [54] entwickelte, unter dem Namen Chirasil-Val bekannte Säule erlaubt die Trennung der meisten D- und L-AS in einem chromatographischen Lauf [60-65].

AS sind aufgrund ihrer zwitterionischen Struktur nicht unzersetzt verdampfbar und müssen durch Polaritätssenkung an den ladungstragenden Carboxyl- und Amino- gruppen zu Verbindungen mit niedrigeren Siedepunkten derivatisiert werden [66]. Die Detektion der AS-Derivate erfolgt zumeist mittels Flammenionisationsdetektor (FID) oder massenspektrometrisch (GC/MS; MSD) [67]. Die sich bei einer Perfluoracylierung der AS anbietende halogen-spezifische Detektion mittels Elektroneneinfang Detektor (ECD) bietet kaum Vorteile gegenüber dem FID und wird deshalb nur selten angewandt. Gleiches gilt für eine Stickstoff-spezifische Detektion (NPD) [68,69].

1.1.2.3 Flüssigchromatographie

1.1.2.3.1 Methoden der achiralen flüssigchromatographischen Aminosäureanalytik

Die "Moore-Stein-Technik" genannte AS-Bestimmungsmethode war vor Verwendung der HPLC-Verfahren die bedeutendste flüssigchromatographischen AS-Analysenmethode [70]. Bei dieser Methode werden die AS mittels Ionenaustauschchromatographie (IAC) getrennt und nach der Elution mit Ninhydrin umgesetzt, wobei in einer dem Strecker-Abbau vergleichbaren Reaktionsfolge farbige Verbindungen gebildet werden. Diese Umsetzung ist spezifisch für Amino- und Iminogruppen. Allerdings besitzen die aus primären bzw. sekundären AS entstehenden Verbindungen sehr unterschiedliche Absorptionsmaxima (570 bzw. 440 nm).

Um höhere Nachweisempfindlichkeiten zu erhalten wies ROTH [71] auf die Bildung von fluoreszierenden AS-Derivaten bei Umsetzung von AS mit *o*-Diacetylbenzol oder *o*-Phthaldialdehyd (OPA) in Gegenwart reduzierender Agentien wie KBH_4 oder

Thiolen wie z.B. 2-Mercaptoethanol (ME) oder 3-Mercaptopropionsäure (MPA) in alkalischer Lösung hin [71]. Diese Nachsäulenderivatisierung kam auch in den ersten HPLC-Systemen zum Einsatz. Heute dominieren eine Reihe von HPLC-Verfahren, bei denen im Anschluß an eine Vorsäulenderivatisierung eine Trennung der gebildeten AS-Derivate an Reversed-Phase-Säulen erfolgt. Die zu diesem Zweck am häufigsten angewandten Umsetzungen sind diejenige mit OPA zusammen mit einem Thiol, mit Phenylisothiocyanat (PITC) [72], mit 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC-Cl) [73], mit 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonsäurechlorid (DANSYL-Cl) [74] und diejenige mit 4-Dimethylaminoazobenzol-1-sulfonsäurechlorid (DABSYL-Cl) [75].

Die Derivatisierung mit OPA/Thiol ist spezifisch für primäre Aminogruppen und somit selektiver als die Umsetzung mit Ninhydrin. Ein Nachteil des genannten OPA/Thiol-Verfahrens ist die alleinige Umsetzung von primären AS [76]. Durch eine zweite Derivatisierung mit einem entsprechenden Reagenz für die sekundären AS können dann beide AS-Gruppe in einer chromatographischen Trennung bestimmt werden. Dieses Prinzip wurde mit der Kombination von OPA/Thiol und FMOC-Cl etabliert und wird häufig eingesetzt (siehe Kap. 3.1)

1.1.2.3.2 Methoden der chiralen flüssigchromatographischen Aminosäureanalytik

Bei den unterschiedlichen chromatographischen Verfahren zur Bestimmung von D- und L-AS muß zwischen den verschiedenen Trennungsvorgängen der direkten Enantiomerentrennung sowie der indirekten Diastereomerentrennung nach erfolgter Derivatisierung mit einem chiralen Reagenz unterschieden werden [77]. Bei den direkten Methoden werden die Enantiomere als solche entweder durch Ligandenaustauschchromatographie (LEC) [78] oder an chiralen stationären Phasen [79] getrennt. Wegen der gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften der optischen Antipoden wird bei dieser Methode eine chirale stationären Phase benötigt, wobei im Falle der LEC auch eine chirale mobile Phase eingesetzt werden kann. Die Auftrennung der Enantiomere wird hierbei durch Ausbildung energetisch unterschiedlicher diastereomerer Assoziationskomplexe mit dem chiralen Selektor erzielt

[80]. HARE und GIL-AV [81] trennten DL-AS als diastereomere Kupferkomplexe mit einem AS-Analysator, indem sie L- oder D-Prolin und Kupfer(II)-sulfat dem Eluenten beifügten. GÜBITZ et al. [82] nutzten die LEC mit an Kieselgel gebundenen chiralen Selektoren (L-Pipecolinsäure und andere L-AS) zur DL-AS-Trennung. PALLA et al. [58] trennten Dansyl-DL-AS-Derivate an einer RP-Phase durch Zusatz von L-Phenylalaninamid und Kupfer(II)-sulfat zum Eluenten. Von anderen geeigneten chiralen stationären Phasen seien hier Proteinphasen [83], chirale Kronenetherphasen [84], Cyclodextrinphasen [85,86] und Pirkle-Phasen [87] genannt.

Bei den indirekten Methoden werden hingegen nach erfolgter Derivatisierung mit einem chiralen Reagenz Diastereomere getrennt, die nicht mehr Spiegelbildisomere sind und verschiedene Energieinhalte sowie unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften besitzen. Sie lassen sich daher an konventionellen achiralen Phasen, die in großer Zahl zur Verfügung stehen, trennen. Bei dieser Methoden haben sich häufig Verfahren mit chiralen Varianten von in der achiralen AS-Analytik eingesetzten Derivatisierungsreagenzien etabliert. Breite Anwendung für komplexe Gesamttrennungen von D- und L-AS findet unter den verschiedenen Methoden die Vorsäulenderivatisierung von AS mit OPA und chiralen Thiolen, deren systematische Entwicklung und Varianten im folgenden Abschnitt gesondert dargestellt werden sollen (siehe Kap. 3.1). EINARSSON et al. [73,88] gelang die Trennung von 17 Paaren diastereomerer DL-AS-Derivate nach Vorsäulenderivatisierung mit (+)-1-(9-Fluor-enyl)ethylchloroformiat (FLEC), der chiralen Modifikation von FMOC-Cl. Hervorragende Trennungen der diastereomeren Derivate einzelner DL-AS-Paare konnten mit chiralen Varianten des Sanger-Reagenzes (1-Fluor-2,4-dinitrobenzol), wie z.B. *N*²-(5-Fluor-2,4-dinitrophenyl)-L-alaninamid (FDNP-L-Ala-NH₂) sowie FDNP-L-Val-NH₂, FDNP-L-Phe-NH₂ und FDNP-L-Pro-NH₂ erzielt werden [89-91]. Gleiches gilt auch für die chiralen Isothiocyanate bzw. Isocyanate, wie 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylisothiocyanat (GITC) [92] 2,3,4-Tri-O-acetyl-α-D-arabinopyranosylisothiocyanat (AITC) [93], (R)-α-Methylbenzylisothiocyanat [94] und 1-(1-Naphthyl)ethylisocyanat (NEI) [95]. Alle weitere chirale Derivatisierungsreagenzien, die flüssigchromatographische Auftrennung von komplexen DL-AS-Mischungen ermöglichen, eignen sich zu dem Succinimido-1-phenylethylcarbammat (SIPEC) und Succinimido-1-(α-naphthyl)ethylcarbammat (SINEC) [96], *N*-1-(2-Naphthylsulphonyl)-2-pyrrolidincarbonylchlorid (NSP-Cl) [97], S-Flunoxapfenchlorid [98] sowie ver-

schieden aminosäuresubstituierte Monohalo-s-triazine [99,100] und ungeschützte (NCA's) [101] sowie Urethangeschützte *N*-Carboxyanhydride von AS [102].

1.2 Bedeutung und Vorkommen von biogenen Aminen

Bei den biogenen Amine (BA) handelt es sich um stickstoffhaltige, basische Verbindungen, die eine aliphatische, aromatische oder heterocyclische Struktur besitzen können [103-107]. Aufgrund ihrer biotischen Herkunft und ihrer Wirkung in biologischen Systemen werden sie als „biogene“ Amine bezeichnet. Die Struktur der wichtigsten BA ist in Abbildungen 1-1 und 1-2 dargestellt.

BA werden im allgemein je nach Anzahl ihrer enthaltenen Aminogruppen den Mono- bzw. den Polyaminen zugeordnet [107]. Sie entstehen im Stoffwechsel von Tieren, Pflanzen oder MO [103,104]. Da ihre Bildung größtenteils aus AS erfolgt, sind besonders hohe Amingehalte in Lebensmitteln (LM) zu erwarten, bei deren Herstellung bzw. Verarbeitung oder Lagerung biochemische oder mikrobiologische Eiweißveränderungen wie Fermentation oder Verderb stattfinden [107-110].

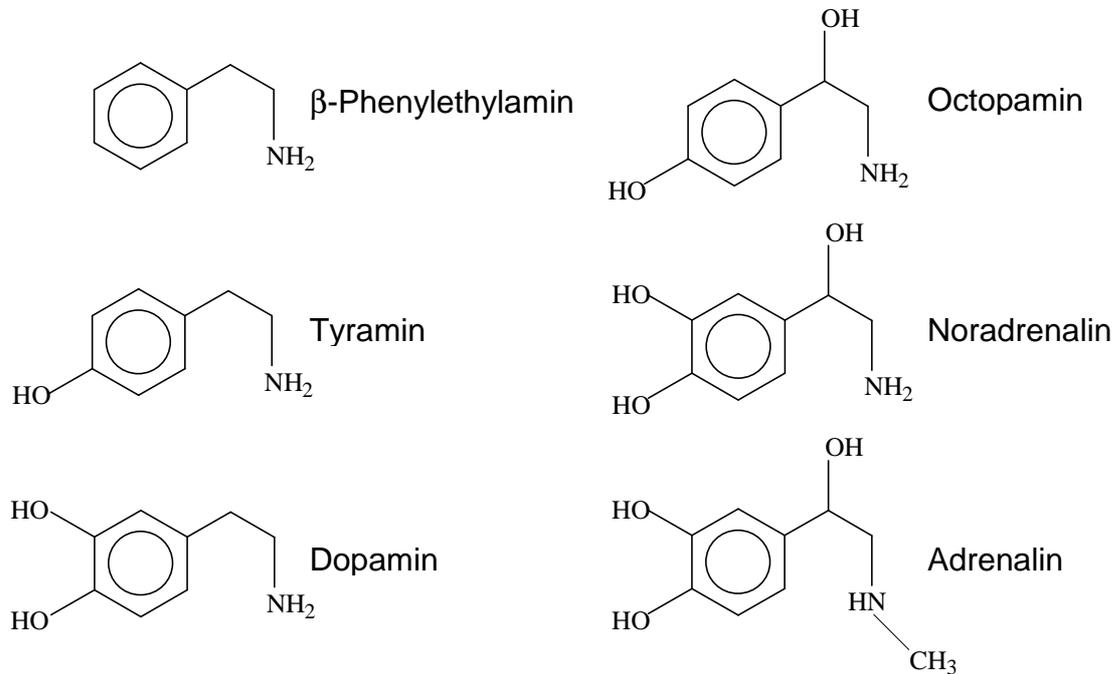
BA haben im Stoffwechsel und in LM eine vielseitige Bedeutung. Im Stoffwechsel wirken sie u.a. als Hormone (Katecholamine, Serotonin), Wachstumsfaktoren (Putrescin, Spermidin, Spermin), dienen als Pharmaka und stellen Gewebsmediatoren dar (Histamin, Serotonin). Sie spielen eine Rolle in LM als Aroma- und Geschmacksstoffe, als Vorstufen zur Biosynthesen von Alkaloiden und Nitrosaminen, und tragen zur Qualitätsbeurteilung von LM, insbesondere Fisch, bei [104,105,107].

Aliphatische Monoamine

$\text{CH}_3\text{-NH}_2$	Methylamin	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$	Butylamin
$(\text{CH}_3)_2\text{NH}$	Dimethylamin	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$	Amylamin
$(\text{CH}_3)_3\text{N}$	Trimethylamin	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$	Hexylamin
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-NH}_2$	Ethylamin	$\text{HO-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH}_2$	Ethanolamin
$(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_2\text{NH}$	Diethylamin	$\text{HS-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH}_2$	Cysteamin
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH}_2$	Propylamin	$\text{HO}_3\text{S-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH}_2$	Taurin

Aliphatische Polyamine

$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	Putrescin
$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$	Cadaverin
$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	Spermidin
$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	Spermin
$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2 \end{array}$	Agmatin

Abb. 1-1: Chemische Strukturen aliphatischer AmineAromatische Amine

Heterocyclische Amine

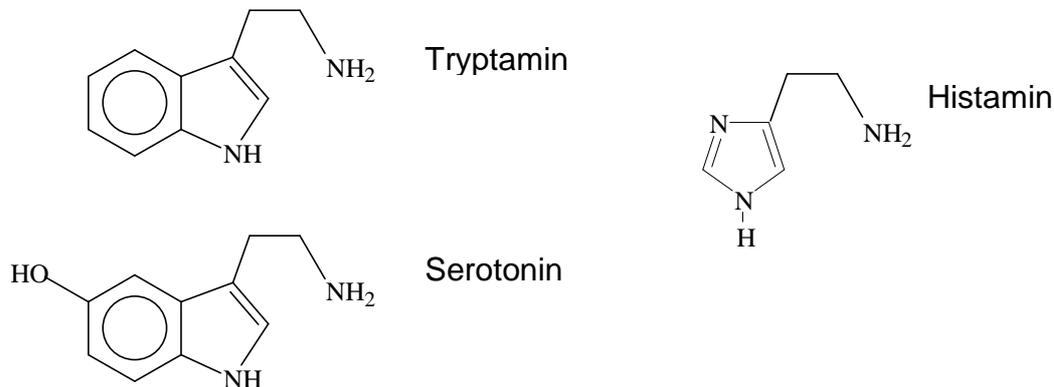


Abb. 1-2: Chemische Strukturen aromatischer und heterocyclischer Amine

1.2.1 Entstehung biogener Amine in Lebensmittel

Biogene Amine entstehen in LM hauptsächlich auf drei Wegen [107];

- Decarboxylierung von Aminosäuren
- Aminierung von Aldehyden bzw. Ketonen
- Abbau stickstoffhaltiger Verbindungen

BA werden in Lebensmitteln vorrangig durch eine Decarboxylierungsreaktion von AS als Folge eines metabolischen Vorgangs in Tieren, Pflanzen oder Mikroorganismen gebildet [107,111-113]. Die Entstehung biogener Amine ist damit abhängig vom Vorhandensein freier AS, aus denen durch Aktivität der entsprechenden Decarboxylasen die korrespondierenden Amine gebildet werden (Tab. 1-1). Decarboxylasen sind in tierischen und pflanzlichen Zellen sowie in MO nachzuweisen, wobei besonders die Bakterien eine hohe Decarboxylasenaktivität besitzen, was das Vorkommen von Aminen in fermentierten bzw. in Verderbnis unterworfenen, eiweißreichen LM erklärt [105,106,111-113].

Tab. 1-1: Auswahl an durch Decarboxylierung von Aminosäuren entstehenden biogenen Aminen [110]

Aminosäure	Resultierendes Amin
Arginin	Agmatin
Dihydroxyphenylalanin	Dopamin
Dihydroxyphenylserin	Noradrenalin
Histidin	Histamin
5-Hydroxytryptophan	Serotonin
Lysin	Cadaverin
Ornithin	Putrescin
Phenylalanin	β -Phenylethylamin
Tryptophan	Tryptamin
Tyrosin	Tyramin

Eine Besonderheit stellt die Synthese von Putrescin (Put), Spermidin (Spd) und Spermin (Spm) dar. Diese Amine können über mehrere Zwischenschritte aus Arginin oder Ornithin entstehen (Abb. 1-3) [114,115]. Die Aminierung von Aldehyden bzw. Ketonen wird als Syntheseweg aliphatischer Mono- und Diamine bzw. sekundärer Amine in Tieren und Pflanzen genannt [105]. Katalysierende Enzyme stellen die Transaminasen dar, welche, ähnlich den Decarboxylasen, Pyridoxin als Cofaktor benötigen. Weiterhin können beim Abbau stickstoffhaltiger Verbindungen verschiedene aliphatische Amine entstehen, wie z.B. Methyl-, Dimethyl-, Ethyl- oder Ethanolamin [105,106,116].

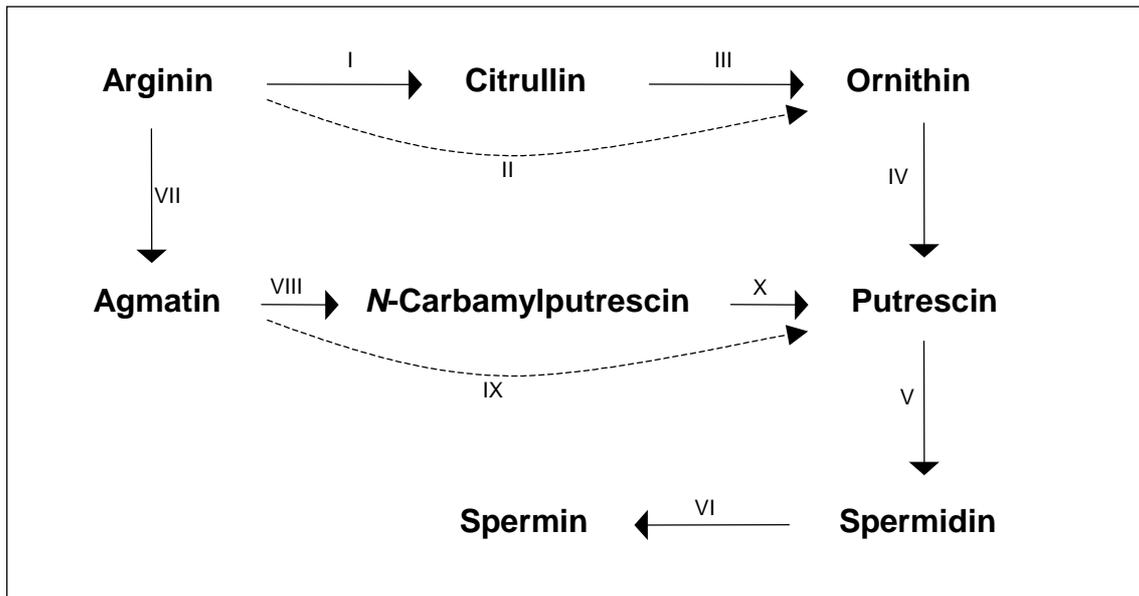


Abb. 1-3: Zusammenhänge der Bildungswege der Polyamine [105,114]; I Arginindeiminase, II Arginase, III Ornithincarbamoyltransferase, IV Ornithindecaboxylase, V Spermidinsynthese, VI Sperminsynthese, VII Arginindecaboxylase, VIII Agmatindeiminase, IX Agmatinase, X *N*-Carbamoylputrescinhydrolase

1.2.2 Bildung von biogenen Aminen durch Mikroorganismen

Mikroorganismen (MO) tragen zur Entstehung von BA in Lebensmitteln bei. Insbesondere in LM, die einer mikrobiellen Fermentation unterzogen wurden oder mikrobiell verdorben sind, können höhere Konzentrationen an BA gefunden werden. Die dafür verantwortlichen MO sind starke Decarboxylasebildner, die zum größten Teil zu den Familien der *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae* und einer Vielzahl von Milchsäurebakterien wie *Lactobacillen*, *Streptococcen* und *Pediococcen* gehören [107,113,117].

Von besonderer Bedeutung im Hinblick auf nahrungsmittelbedingte Histamin-Intoxikationen sind die Histidindecaboxylase-bildenden MO. Nach KRÄMER [117] zählt neben den *Enterobacteriaceae*-Gattungen z.B. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Proteus*, *Salmonella* und *Citrobacter*. KARNOP [118] wies für *Pediococcus ha-*

lophilus und *Proteus morganii* ein Histamin-Bildungspotential nach, STRAUB et al. [119] für einige Milchsäurebakterien u.a. *Lactobacillus (Lb.) alimentarius*, *Lb. buchneri* und *Lb. casei*.

Weitaus bekannter sind die Milchsäurebakterien als Tyraminbildner u.a. *Enterococcus*-Spezies wie *Ec. faecalis*, *Ec. durans* und *Lactobacillus*-Arten wie *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. helveticus* und *Lb. lactis* [120]. STRAUB et al. [119] konnten des weiteren bei *Lb. buchneri*, *Lb. curvatus* und *Lb. delbrueckii* spp. *lactis* und einigen *Carnobacterium*-Spezies ein Tyraminbildungsvermögen nachweisen [121].

Das Bildungsvermögen anderer Amine durch MO ist bisher nicht eingehend genug untersucht worden. Es ist bekannt, daß *Clostridium*- und *Bacillus*-Spezies für den Tryptophanabbau und damit für die Bildung von Trm in Frage kommen, den Enterobacteriaceae und Lactobacillen wird des weiteren eine Bedeutung bei der Putrescinsynthese zugesprochen [122,123].

1.2.3 Biogene Amine als Kriterium zur Qualitätsberurteilung in Lebensmitteln

Das Vorkommen von MO und deren Stoffwechselaktivität beeinflusst in hohem Maße den hygienischen Zustand eines Lebensmittels. Allerdings bedeutet die Anwesenheit von MO nicht immer einen Qualitätsmangel, da z.B. fermentierte LM durch Zusatz von MO hergestellt werden und trotzdem hygienisch unbedenklich sind [124,125]. In unfermentierten LM wird ein erhöhter Amingehalt jedoch als Indikator einer mikrobiellen Kontamination angesehen [107]. Voraussetzungen für die Aminbildung sind neben der Anwesenheit der entsprechenden MO auch das Vorkommen freier AS sowie günstige Bedingungen für MO-Wachstum und Decarboxylaseaktivität [111-113,126].

Der Anteil der einzelnen BA hängt dabei von den Konzentrationen der AS im entsprechenden LM ab, wobei freie AS bevorzugt abgebaut werden. Im allgemeinen reduzieren sich durch Aktivität von MO die Gehalte an Spd und Spm, während v.a. die Gehalte an Tym, Cad, Him und Put steigen. Aus diesem Grunde wird die Menge

an Aminen zur Beurteilung der mikrobiellen Belastung von LM vorgeschlagen [105,127,128].

Bei Fischen wurde der Gehalt an Him als Qualitätskriterium vorgeschlagen. KAR-MAS [129] erstellte einen „Biogenen Amin Index“ (BAI) zur Beurteilung der Qualität von Fisch und Fischprodukten, in dem die Verderbnisamine Put, Cad und Him in Relation zu den natürlich enthaltenen Aminen Spd und Spm gesetzt werden. Der BAI wird wie folgt berechnet:

$$\text{BAI} = \frac{C_{\text{Him}} + C_{\text{Put}} + C_{\text{Cad}}}{1 + C_{\text{Spd}} + C_{\text{Spm}}}$$

C = Konzentration [mg/kg]

Für die Beurteilung von Fisch und Fischprodukten zeigen BAI-Werte bis 1 eine gute Qualität, während bei Verderb der BAI auf über 10 ansteigen kann.

Ein weiterer Aminindex, welcher von VECIANA-NOGUÈS et al. [130] zur Beurteilung von Fisch, v.a. Thunfisch, vorgeschlagen wird, bildet die Summe der Amine Cad, Put, Him und Tym. Dabei bedeuten Werte unter 50 µg/g eine akzeptable Qualität [131]. Derselbe Aminindex wird auch zur Beurteilung der Fleischqualität vorgeschlagen. Der Amingehalt kann auch zur Beurteilung weiterer LM wie z.B. Milch und Milchprodukten, Feinkosterzeugnissen und Wein herangezogen werden [132].

1.3 Asiatisch fermentierte Lebensmittel (“Oriental“ oder “Asian“ Fermented Food)

Als “Oriental“ oder “Asian“ Fermented Food werden im englischen Sprachraum Lebensmittel bezeichnet, die in asiatischen Ländern traditionell unter Einsatz spezieller Mikroorganismen (MO) gewonnen werden (Abb. 1-4) [133]. Die eingesetzte Starterkulturen sind andere als bei traditionellen europäischen Lebensmitteln, denn die meisten Fermentationen werden mit Hilfe von Pilzen, weniger mit Milchsäurebakterien oder Hefen, durchgeführt [134]. Während in Europa die Anwendung von Bakterien und Hefen zur Herstellung von fermentierten Lebensmitteln eine lange Tradition hat, sind mit Schimmelpilzen fermentierte Lebensmittel vor allem in Asien weit verbreitet. Ihre Herstellung wurde besonders auf der Basis von Leguminosen und Getreide in großem Umfang und breiter Vielfalt entwickelt [133,135].

Unter den Leguminosen stellen die fermentierten Sojaprodukte innerhalb der pflanzlichen Lebensmittel biotechnologisch eine Ausnahme dar. Dies ergibt sich aus der Notwendigkeit, die verdauungsstörenden Trypsininhibitoren und die Flatulenz erzeugenden galaktosehaltigen Oligosaccharide (Raffinose, Stachyose) der Sojabohne in erster Linie durch weitgehende Hydrolyse bis zur Unwirksamkeit abzubauen. Da Milchsäurebakterien nur eine geringe hydrolytische Aktivität entwickeln, sind Pilze, die ein Gemisch von Hydrolasen ausscheiden, dafür sehr viel besser geeignet [134].

Die Bedeutung der Beteiligung der Milchsäuregärung bei Fermentationsverfahren der Sojaprodukten liegt weniger in der direkten Beeinflussung des Endproduktes durch die Stoffwechselprodukte der Milchsäurebakterien. Milchsäurebakterien siedeln sich dabei erst sekundär im Verlauf der Pilzfermentationen an. Nur in den über längere Zeit ausgedehnten und mit weitgehender Verflüssigung verbundenen Fermentationen wurde die sekundäre Milchsäuregärung auch zu einem technologisch wichtigen Schritt, da sie durch die Absenkung des pH-Wertes die Pilzfermentation reguliert und durch Säure- und Aromaproduktion zu einer Geschmacksverbesserung führt [134,136].

1.3.1 Koji

Unter Koji versteht man mit Schimmelpilzen überwachsenes gedämpftes Getreide und/oder Sojabohnen [133,137]. Koji ist reich an Enzymen, die Stärke zu vergärbaren Zuckern und Eiweiß zu Peptiden, Peptonen und Aminosäuren abbauen. Die Kojiherstellung bildet allgemein die erste Stufe im Herstellungsprozeß fermentierter Sojaprodukte und umfaßt auch die Herstellung der Koji-Starterkulturen. Zur Herstellung von Koji-Starterkulturen wird polierter Reis über Nacht eingeweicht, überschüssiges Wasser abgetrennt, gedämpft und mit Pilzen u.a. *Aspergillus oryzae* oder *A. soyae* sowie deren Mutanten, beimpft. Diese werden unter dem Gesichtspunkt der Bildung einer ausgewogenen Mischung hydrolytischer Enzyme (Proteasen, Amylasen) selektiert [134,136].

Die Koji-Starterkulturen werden mit Sojabohnen und Getreide beimpft und für 2-3 Tage bei 25-30 °C inkubiert. Je nach fermentiertem Sojaprodukt werden verschiedene Koji durch Mischung von unterschiedlichen Mengen an Soja und Weizen hergestellt.

1.3.2 Sojasaucen

Sojasauce ist eine dunkelbraune salzige Flüssigkeit mit angenehm fleisch- oder nußähnlichem Aroma und gehört zu den bekanntesten ostasiatischen Würzmitteln zur Geschmacks- und Aromagebung [134,140]. Sie wird traditionell unter Verwendung von Sojabohnenkoji und/oder Weizenkoji durch mehrstufige Fermentation mittels verschiedener MO u.a. Bakterien und Hefen, hergestellt und zählt im asiatischen Raum zu den am längsten bekannten fermentierten Lebensmitteln [138,139].

Die zahlreichen durch Fermentation erzeugten Sojasaucen variieren je nach eingesetzten Rohstoffen, MO und Verarbeitungsprozeduren und unterscheiden sich in Aroma, Geschmack und Farbe. Die japanische Sojasauce "Shoyu" zeichnet sich durch mildes Aroma und dunkelrotbraune Farbe aus und wird aus gleichen Teilen Sojabohnen- und Weizenkoji gewonnen [138]. Die chinesische Sojasauce "Chiang-yiu" ist in Aroma, Geschmack und Farbe stärker und wird überwiegend aus Sojabohnenkoji hergestellt. In Korea werden Sojasaucen allgemein mit "Kanjang" be-

zeichnet und außer in industrieller Produktion traditionell zu Hause durch natürliche Infektion fermentativ hergestellt [134].

1.3.2.1 Fermentierte Sojasaucen

Die Herstellung der fermentierten Sojasaucen umfaßt eine aerobe Stufe der Pilzvermehrung zur Produktion hydrolytischer Enzyme (Koji, siehe Kap. 1.3.1) und eine anaerobe Stufe mit milchsaurer und alkoholischer Gärung. Die wesentlichen Variationen des Verfahrens beruhen auf der unterschiedlichen Art, Menge und Vorbehandlung der Getreidezuschläge und der Verwendung von Starterkulturen [139-142].

Das Koji (Gemisch aus Substrat, Pilzmycel und ausgeschiedene Hydrolasen) wird mit einer Kochsalzlösung zu einer Maische (Moromi) mit etwa 18 % Kochsalz verührt. Der hohe Kochsalzgehalt soll dabei das Wachstum unerwünschter Bakterien und Pilze unterdrücken. Die Maische wird zu Beginn der Fermentation mit Milchsäurebakterien wie z.B. *Pediococcus (Pc.) halophilus*, *Pc. cerevisiae*, *Pc. soyae*, *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus delbrueckii* und Hefen beimpft, die an der Geschmacksbildung entscheidend beteiligt sind [138]. Durch eine Milchsäuregärung wird ein pH-Abfall von anfangs 6,5 - 7,0 auf 5,5 herbeigeführt, so daß günstige Bedingungen für die Entwicklung der halotoleranten Hefen (*Saccharomyces rouxii*, *Torulopsis* spp. oder *Candida* spp.) bestehen, welche die durch Hydrolyse der Polysaccharide entstandenen Spaltprodukte zu Ethanol, Glycerol, Furfural, organischen Säuren sowie Aroma- und Geschmacksstoffen konvertieren [139]. Nach einer Fermentationsdauer von 3-12 Monaten wird die Flüssigkeit durch Pressen abgesondert, pasteurisiert, gefiltert und schließlich abgefüllt.

1.3.2.2 Gemischte Sojasaucen

Ein sehr viel rascheres Verfahren zur Herstellung von Sojasauce als es die Fermentation ist, stellt die Hydrolyse des Ausgangsmaterials (meistens Sojabohnen) mit Salzsäure dar. Sojabohnen oder Gemische mit Weizen werden in 18 - 22 %iger

Salzsäure für 20 - 72 Stunden gekocht. Anschließend wird das Gemisch filtriert und mit Natronlauge auf pH 4,0 - 4,5 eingestellt und Salz bis zum Gehalt von 18 % zugesetzt. Derartige Produkte weisen ein wenig spezifisches Aroma und Geschmack auf [138]. Die Sojasaucenhydrolysate werden zur Verbesserung des Aromas vereinzelt mit fermentierten Sojasaucen vermischt und gelangen als solche in den Handel.

1.3.3 Miso und Pepperonipasten

Bei Miso und Pepperonipasten handelt es sich um eine fermentierte Paste, die aus einem Gemisch von Sojabohnen und Gerste oder Reis bzw. Weizen mit Hilfe von Koji bei sehr hohen Kochsalzkonzentration gewonnen wird [133,141]. Miso und Pepperonipasten weisen eine erdnußbutterähnliche Konsistenz auf und haben ein angenehmes Aroma [134]. Sie sind, ähnlich der Sojasauce, beliebte Lebensmittel in Ostasien und dienen vor allem als Saucenbasis oder werden zu verschiedenen Fleisch- und Fischgerichten gereicht.

Bezüglich der verwendeten MO und der Fermentationsverfahren ist die Herstellung von Miso und Pepperonipasten der Sojasaucenherstellung sehr ähnlich. Die beiden Produkte lassen sich je nach Einsatz bzw. Dominanz verschiedener Koji und Rohstoffe unterscheiden. Zur Herstellung von Miso werden Reis, Weizen oder Gerste unter Verwendung von Sojabohnenkoji eingesetzt. Für Pepperonipasten wird im Vergleich zu Miso ein mengenmäßig geringerer Sojabohnenkojianteil und mehr Weizen oder Reis als zweite Ausgangssubstanz verwendet [134,135]. Zusätzlich wird Pepperonipulver zugesetzt, welches für den schafen Geschmack verantwortlich ist. Das Gemisch wird dann einer mehrere Monate dauernden Fermentation unter Einwirkung von Bakterien und Hefen unterworfen. Dabei werden dieselben Reinkulturen wie bei Sojasaucen verwendet. Nach der Fermentation wird das Produkt zur Paste zerquetscht, pasteurisiert und abgefüllt.

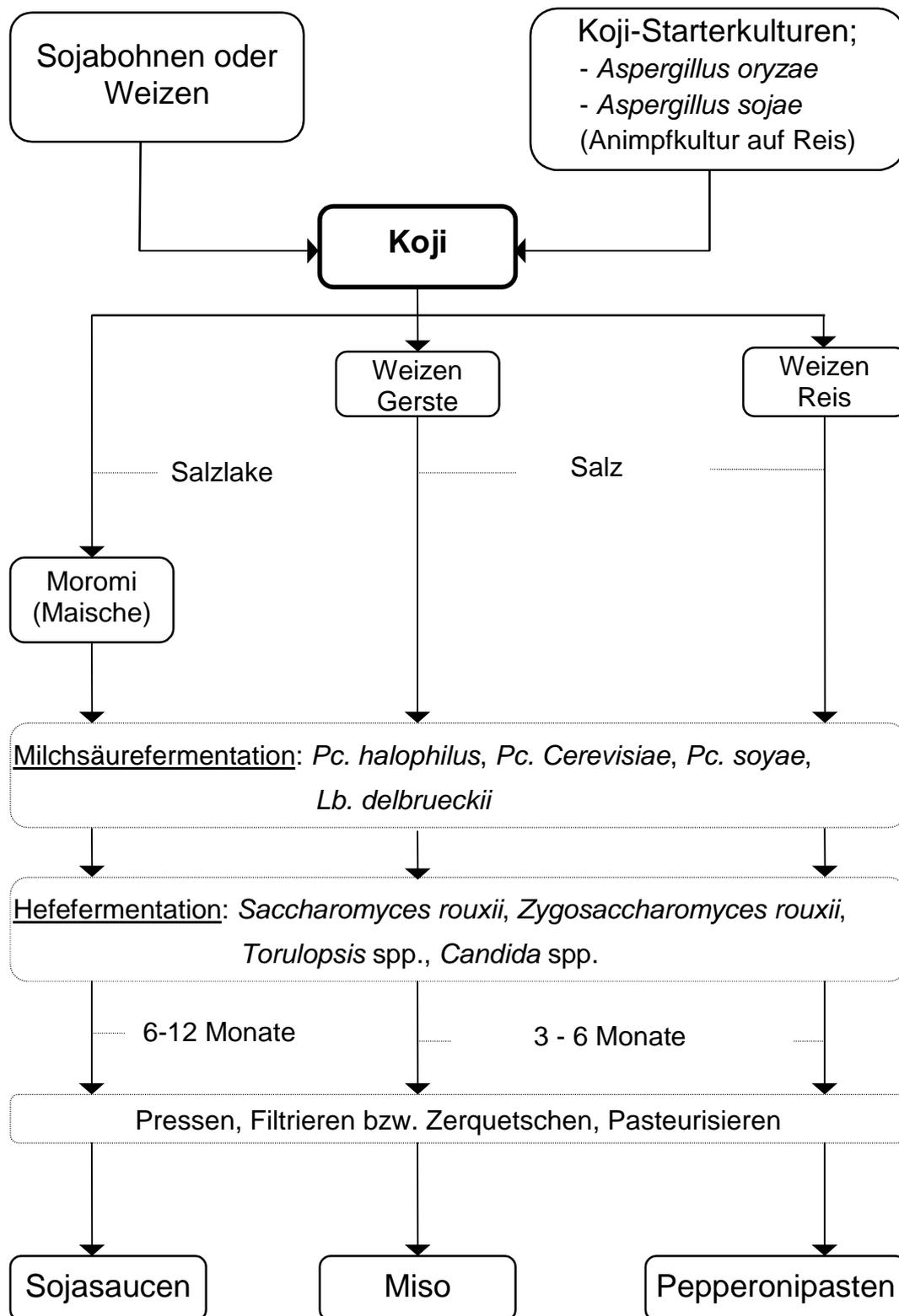


Abb. 1-4: Herstellungsprozeß von fermentierten Sojaprodukten

1.4 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden Aminosäuren und biogene Amine in asiatisch fermentierten Lebensmitteln (engl. "Oriental" oder "Asian" Fermented Food) exemplarisch anhand einer Gruppe fermentierter Sojaprodukte u. a. Sojasaucen, Miso und Pepperonipasten, sowie Sake und Fischsaucen mittels HPLC untersucht. Der Schwerpunkt lag hierbei bei der Verwendung der Meßdaten zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle für die untersuchten LM.

Zur achiralen AS-Analyse sollte zunächst eine HPLC-Methode nach Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd/3-Mercaptopropionsäure (OPA/MPA) mit Kombination von 9-Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (FMOC-Cl) zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung fermentierter Lebensmittel eingesetzt werden. Darüber hinaus sollte das Vorkommen von bestimmten nichtproteinogenen AS im Hinblick auf den Nachweis für mikrobielle Fermentation untersucht werden.

Weiterhin wurde eine chirale HPLC-Methode nach Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd und *N*-Isobutyryl-L (bzw. D)-cystein (OPA/IBL(D)C) zur Trennung und Bestimmung von freien D-AS verwendet. In allen Fällen sollte einer D-Aminosäurepräsenz in den untersuchten Lebensmitteln deren Ursache sowie Bedeutung diskutiert werden. Die Anwendbarkeit und Vergleichbarkeit der OPA/IBL(D)C-Methode für verschiedene HPLC-Apparaturen zur enantioselektiven Aminosäureanalytik sollte am Beispiel von LaChrom - und HP 1090-System überprüft werden.

Im Hinblick auf einen Einsatz der HPLC-Methode zur enantioselektiven AS-Analytik in verschiedensten Anwendungsbereichen sollten die Elutionspositionen möglichst vieler AS unter Standardbedingungen festgestellt werden.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Untersuchung der biogenen Aminen als Ergänzung zur Qualitätskontrolle für fermentierte Lebensmittel unter Einsatz einer HPLC-Methode nach Vorsäulenderivatisierung mit *para*-Nitro-benzyloxycarbonylchlorid (PNZ-Cl).

2 MATERIAL

2.1 Instrumentelle Anordnung

2.1.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Instrument I

HP 1090 Series, Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn Deutschland, ausgestattet mit:

- Zwei Niederdruck-Doppelkolben-Pumpen zur binären Gradientenbildung SDS/DR 5, Hochdruck-Membran-Pumpe, Helium-Eluenten-Entgasungsvorrichtung
- Programmierbarem Probengeber mit variablem Injektionsvolumen für automatische Proben-Vorsäulenderivatisierung in der Probenschleife (25 µl), Probenrack für 1,5 ml-Gläser und - mit Adaptereinsätzen - für 200 µl Mikro-Vials als Probengefäße
- Umluftsäulenofen mit Thermostat und Anschlußmöglichkeit für Kryostaten zur Gegenkühlung
- Diodenarray-Detektor (DAD)
- Software: HP Chemstation for LC (Rev. A.04.01) basierend auf WINDOWS 3.11

Fluoreszenz-Detektor HP 1046 A (FLD)

- Xenon-Lampe, Frequenz 55 Hz
- Response-time 500 msec
- Photomultiplier (PMT) Gain 7 bis 12
- Flußzelle 5 µl

Instrument II

HP 1100 Series, Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn Deutschland, ausgestattet mit:

- Column Thermostat (Modell G1316A)
- Diodenarray Detektor (Modell G1314G) mit 13 µl Flußzelle

-
- Probengeber (Modell G1313A)
 - Quarternäres Pumpensystem (Modell G1311A) für Niederdruckgradienten
 - Vakuum Degasser (Modell G1322A)
 - Software: HP Chemstation for LC (Rev. A.04.02) basierend auf WINDOWS 95™

Instrument III

LaChrom -System, Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland und Tokio, Japan, ausgestattet mit:

- Pumpe mit Niederdruckgradientensystem (Modell L-7100)
- Programmierbarer Autosampler mit 100 µl-Schleife (Modell L-7250)
- Solvent Degasser (Modell L-7612)
- Column Oven (Modell L-7300)
- Fluorescence-Detektor mit 12 µl-Flußzelle (Modell L-7480), Interface (Modell D-7000)
- Software: Merck-Hitachi (Modell D-7000) Chromatography Data Station Software, P/N: 810-8802-14 basierend auf Microsoft WINDOWS NT 4,0

HPLC-Säulen (stationäre Phasen)

- Hypersil ODS2, 250 mm x 4 mm I.D., Korngröße: 5 µm
- Hypersil ODS2, 20 mm x 4 mm I.D., Korngröße: 5 µm
- Hypersil ODS2, 40 mm x 4 mm I.D., Korngröße: 5 µm (alle von Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland)
- Nova-Pak C₁₈, 300 mm x 3,9 mm I.D., Korngröße: 4 µm (Waters, Eschborn, Deutschland)
- LiChroCART Superspher 100 RP-18e, 250 mm x 4 mm I.D., Korngröße: 4 µm
- LiChroCART Superspher 100 RP-8e, 20 mm x 4 mm I.D., Korngröße: 4 µm
- LiChroCART Superspher 100 RP-18e, 20 mm x 4 mm I.D., Korngröße: 4 µm (alle von Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.1.2 Gaschromatographie (GC)

Instrument

GC-17 A, Duisburg, Deutschland, Shimadzu, Kyoto, Japan, ausgestattet mit:

- Detektor (Quadrupol-Massenspektrometer QP-5000): Detektor-Temperatur 250 °C; Interface-Temperatur 250 °C; Elektronenstoßenergie 70 eV; Detektor Gain 1,5 kV
- Steuerungssoftware: Class 5000 basierend auf WINDOWS 3.11

GC-Säule (stationäre Phase):

- Chirasil-L-Val, Fused Silica Kapillare, 25 m x 0,25 mm I.D. (Chrompack, Middelburg, Niederlande)

2.1.3 Weitere Geräte und Hilfsmittel

- Bidestilliergerät Destamat Bi 18 E (Heraeus Quarzglas GmbH, 63450 Hanau)
- Eppendorfcentrifuge DW 41 (Carl Roth Chemikalien und Laborbedarf, 76185 Karlsruhe)
- Feinwaage AG 245 (Mettler Toledo, 35353 Gießen)
- Heizrührgerät IKA-COMBIMAG RCT (Jahnke & Künkel GmbH & Co.K.G, 79219 Schuell, 37582 Dassel)
- pH-Meter pH 526 MultiCal (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, 82362 Weilheim) mit Sen Tix 50-Elektrode incl. Ag/AgCl- Bezugssystem und TFK 325/HC-Temperaturfühler
- Rotationsverdampfer VV2000, WB 2000 (Heidolph, 93309 Kelkheim)
- Ultraschallgerät Sonorex Super RK 106 (Bandelin Electronic, 12207 Berlin)
- Variopipetten 10-100 µl und 100-1000 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz, 22339 Hamburg)
- Waage PE 3600 (Mettler Toledo, 35353 Gießen)
- Zentrifuge Labofuge 400 (Heraeus Instruments, 37520 Osterode)

2.2 Chemikalien und Reagenzien

2.2.1 Aminosäuren

L-Aminosäure-Standardlösung

(Konzentration je Aminosäure 2,5 mM, nur Cys₂ 1,25 mM, jeweils in 0,1 M HCl)

L-Ala, Ammoniumchlorid, L-Arg, L-Asp, L-Cys, L-Glu, Gly, L-His, L-Ile, L-Leu, L-Lys, L-Met, L-Phe, L-Pro, L-Ser, L-Thr, L-Tyr, L-Val (Pierce, Rockford, IL, USA)

Einzel Aminosäuren (L-, D-, DL- und achirale Aminosäuren)

L-Aminosäuren L-Ala, L-Arg, L-Asn, L-Asp, L-Gln, L-Glu, L-His, L-Ile, L-Leu, L-Lys, L-Met, L-Phe, L-Pro, L-Sar, L-Ser, L-Thr, L-Trp, L-Tyr, L-Val, (jeweils von Sigma, St. Louis, Mo, USA);
L-Orn, L-Nle, L-Cit, L-Nva (jeweils von Merck, Darmstadt, Deutschland)

D-Aminosäuren D-Ala, D-Arg, D-Asn, D-Asp, D-Gln, D-Glu, D-His, D-Ile, D-Leu, D-Lys, D-Met, D-Phe, D-Pro, D-Ser, D-Thr, D-Trp, D-Tyr, D-Val, D-Orn, D-Cit (jeweil von Sigma, St. Louis, Mo, USA)

DL-Aminosäuren DL-Ala, DL-Arg, DL-Asn, DL-Asp, DL-Gln, DL-Glu, DL-His, DL-Ile, DL-Leu, DL-Lys, DL-Met, DL-Phe, DL-Pro, DL-Ser, DL-Thr, DL-Trp, DL-Tyr, DL-Val, DL-Orn, DL-Cit (jeweils von Sigma, St. Louis, Mo, USA)

2.2.2 Biogene Amine

Aldrich-Chemie, 89555 Steinheim, Deutschland

1, 6-Diaminohexan-dihydrochlorid

Artikel-Nr.: 24,773-1

Histamin-dihydrochlorid

Artikel-Nr.: 11,260-7

Fluka, Sigma-Aldrich, 82041 Deisenheim, Deutschland

DL-Octopamin-hydrochlorid	Artikel-Nr.: 74980
Heptylamin	Artikel-Nr.: 51960
2-Phenylethylamin-hydrochlorid	Artikel-Nr.: 77905
Putrescin-dihydrochlorid	Artikel-Nr.: 32810
Serotonin-hydrochlorid	Artikel-Nr.: 85036
Spermin-tetrahydrochlorid	Artikel-Nr.: 85610
Tryptamin	Artikel-Nr.: 93640
Tyramin-hydrochlorid	Artikel-Nr.: 93820

Serva (Boehringer Ingelheim), 69115 Heidelberg, Deutschland

Cadaverin-dihydrochlorid	Artikel-Nr.: 15550
--------------------------	--------------------

2.2.3 Chemikalien zur Probenaufarbeitung und Derivatisierung**Carl Roth, 76185 Karlsruhe, Deutschland**

Aceton	Artikel-Nr.: 5025,5
Acetonitril	Artikel-Nr.: 8825,2
Ammoniak	Artikel-Nr.: 6774,2
n-Butanol	Artikel-Nr.: 7171,1
Dichlormethan	Artikel-Nr.: 6053,2
Essigsäure	Artikel-Nr.: 3738,2
Kaliumhydroxid	Artikel-Nr.: 6751,1
Methanol	Artikel-Nr.: 7342,1
Natriumhydroxid	Artikel-Nr.: 6771,1
2-Propanol	Artikel-Nr.: 6752,2

E. Merck, 64271 Darmstadt, Deutschland

Natriumhydroxid	Artikel-Nr.: 6771,1
o-Phthaldialdehyd	Artikel-Nr.: 11452

Aldrich-Chemie, 89555 Steinheim, Deutschland

Ethanol	Artikel-Nr.: 11,260-7
<i>p</i> -Nitrobenzyloxycarbonylchlorid	Artikel-Nr.: 22,280-1

Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, 82041 Deisenhofen, Deutschland

Borsäure	Artikel-Nr.: 15660
Pentafluorpropionsäureanhydrid	Artikel-Nr.: 77292
Petrolether	Artikel-Nr.: 77380
Salzsäure (32 %)	Artikel-Nr.: 91230
Triethylamin	Artikel-Nr.: 90335
Trifluoressigsäureanhydrid	Artikel-Nr.: 91719

Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz

<i>N</i> -Isobutyryl-L-cystein	Artikel-Nr.: 07518
<i>N</i> -Isobutyryl-D-cystein	Artikel-Nr.: 08343

Merck Schuchardt, 85662 Hohenbrunn, Deutschland

9-(Fluorenylmethyl)chloroformiat	Artikel-Nr.: 818203
----------------------------------	---------------------

Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, 82041 Deisenheim, Deutschland

Dowex 50WX 8, 200-400 mesh, H ⁺ -Form	Artikel-Nr.: 67H1538
--	----------------------

2.2.4 Gase aus Druckgasflaschen für HPLC und GC

Helium 4,6;

Synthetische Luft (20,5 % Vol. O₂ in N₂);

Wasserstoff 5,0;

Stickstoff: technische Qualität (alle Gase von Messer-Griesheim, Düsseldorf, Deutschland)

2.3 Herstellung von Lösungen und Reagenzien

2.3.1 OPA/MPA-FMOC-CI-Methode

2.3.1.1 Aminosäurestammlösungen und Standardgemische OPA/MPA-FMOC-CI-Methode

Zur Herstellung der Aminosäurestammlösungen wurde L-Aminosäurenlösung (Amino Acid Standard H, im folgenden Standard H) von Pierce (Rockford, IL, USA) verwendet (siehe Kap. 2.2.1). Zusätzlich wurden DL-Cit, DL-Orn, Tau und Gaba abgewogen und in Gemisch von MeOH und Kaliumboratpuffer (0,5 M, pH 10,0) (80:20, v:v) (MKB) gelöst, so daß eine Stammlösung mit der Endkonzentration von 2,5 mM erreicht wurde. DL-Asn, DL-Gln sowie DL-Trp wurden wegen ihrer Hydrolyse- bzw. Säureempfindlichkeit in bidest. Wasser gelöst. Die Standardgemische wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit MKB in den Konzentrationen 1, 5, 25, 50 und 200 µM hergestellt. Als interner Standard wurden Nva und Sar verwendet. Um eine Konzentration von 1,0 mM zu erhalten, wurden 1,17 mg Nva und 0,89 mg Sar eingewogen und anschließend mit MKB auf 10 ml aufgefüllt. Alle Stammlösungen und Standardgemische wurden bei -18 ° C aufbewahrt.

2.3.1.2 Reagenzien für OPA/MPA-FMOC-CI-Derivate

Kaliumboratpuffer (0,5 M, pH 10,0)

Zur Herstellung eines 0,5 M Kaliumboratpuffers wurden 3,0915 g Borsäure in 90 ml bidest. Wasser gelöst. Der Ansatz wurde mit 5 M KOH auf pH 10,0 eingestellt und anschließend mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

OPA-MPA

100 mg OPA wurden in 1 ml 0,5 M Kaliumboratpuffer pH 10,0 und 9 ml MeOH gelöst, und anschließend 100 µl Mercaptopropionsäure zugesetzt.

FMOC-Cl (3 mM)

38,8 mg FMOC-Cl wurden abgewogen und in 50 ml Aceton gelöst.

Essigsäure (1 M)

6,005 g Essigsäure wurden mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

2.3.1.3 Eluenten für OPA/MPA-FMOC-Cl-Derivate

Eluent A (0,1 M Natriumacetatpuffer mit 0,044 % TEA, pH 6,5)

27,216 g Natriumacetat trihydrat wurden zur Herstellung von 2 l Eluent A abgewogen und in 1900 ml bidest. Wasser gelöst. Nach Zugabe von 880 µl Triethylamin (TEA) wurde mit 10 % HCl auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Anschließend wurde mit bidest. Wasser auf 2 l aufgefüllt und über ein 0,45 µm Membranfilter filtriert.

Eluent B (Acetonitril 100 %)

2.3.2 OPA/IBL(D)C-Methode

Im folgenden werden die Herstellungen aller Lösungen und Reagenzien für beide Systeme von HP 1090 L und LaChrom dargestellt.

2.3.2.1 Aminosäurestammlösungen und Standardgemische

Zur Herstellung der L-Aminosäurestammlösungen wurde Standard H verwendet. Die jeweiligen D-Aminosäuren wurden zur Herstellung der Stammlösungen im Verhältnis 1:2 (D:L) abgewogen und im MKB-Gemisch gelöst, so daß eine Stammlösung mit der Endkonzentration von 1,25 mM im Bezug von D-AS erreicht wurde. DL-Asn, DL-Gln sowie DL-Trp wurden wegen ihrer Hydrolyse- bzw. Säureempfindlichkeit in bidest. Wasser gelöst. Die Standardgemische wurden durch Verdünnung der

Stammlösungen mit MKB-Gemisch in den Konzentrationen 5, 10, 50, 100 und 200 μM im Bezug von L-AS hergestellt. Als interner Standard wurde L-Abu verwendet. Um eine Konzentration von 100 mM zu erhalten, wurden 103,1 mg L-Abu eingewogen und anschließend mit MKB auf 10 ml aufgefüllt. Alle Stammlösungen und Standardgemische wurden bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

System LaChrom

Es wurden die selben Aminosäurenstammlösungen verwendet und durch Verdünnung der Stammlösungen mit MKB-Gemisch in den Konzentrationen 0,5, 1, 2,5, 5, 10 und 20 μM im Bezug von L-AS hergestellt.

2.3.2.2 Reagenzien für OPA/IBL(D)C-Derivate

Kaliumboratpuffer (1 M, pH 10,4)

6,184 g Borsäure wurden zur Herstellung eines 1 M Kaliumboratpuffers in 80 ml bidest. Wasser gelöst. Der Ansatz wurde mit 5 M KOH auf pH 10,4 eingestellt und anschließend mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

OPA/IBL(D)C

22,80 mg OPA und 49,75 mg IBLC bzw. IBDC wurden in 1 ml 1 M Kaliumboratpuffer pH 10,4 gelöst und bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

System LaChrom

80 mg OPA wurden in 5 ml MeOH und 95 ml 1 M Kaliumboratpuffer pH 10,4 gelöst. Für IBLC bzw. IBDC wurden 24 mg eingewogen und jeweils in 5 ml MeOH gelöst.

2.3.2.3 Eluenten für OPA/IBL(D)C-Derivate

Eluent A (23 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0)

3,130 g Natriumacetattrihydrat wurden in ca 990 ml bidest. Wasser gelöst und mit 10 % Essigsäure auf pH 6,0 eingestellt. Nach dem Auffüllen auf 1 l wurde der Eluent

über ein 0,45 µm Membranfilter gereinigt. Um mögliche Schwankungen des pH-Wertes vermeiden zu können, empfiehlt es sich, den zuletzt benutzten Eluenten als pH-Eichlösung für den neuen Eluenten zu verwenden.

Eluent B (474 g MeOH/39 g MeCN, 12/1, v/v)

Der Eluent wurde durch Einwiegen der entsprechenden Lösungsmittel hergestellt, um eine bessere Reproduzierbarkeit zu erreichen.

System LaChrom

Eluent A (20 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0)

Eluent B (474 g MeOH/39 g MeCN, 12/1, v/v)

2.3.3 PNZ-CI-Methode

2.3.3.1 Stammlösungen und Standardgemische der BA

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden die biogenen Amine Cad, Him, Ocp, Pea, Put, Seo, Spd, Spm, Trm und Tym bzw. deren Hydrochloride in 0,1 M HCl gelöst, so daß jeweils eine Stammlösung mit der Endkonzentration von 5 mM erreicht wurde. Als interner Standard wurde Dhx verwendet. Um eine Konzentration von 10 mM zu erhalten, wurden 18,91 mg 1,6-Diaminohexan-dihydrochlorid eingewogen und anschließend mit bidest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Die Standardgemische wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit 0,1 M HCl in den Konzentrationen von 5, 10, 50, 100 und 200 µM hergestellt. Die Stammlösungen und die Standardgemische wurden bei -18 °C aufbewahrt.

2.3.3.2 Reagenzien für PNZ-Cl-Derivate

Kaliumboratpuffer (0,5 M, pH 8,5)

Zur Herstellung eines 0,5 M Boratpuffers wurden 3,092 g Borsäure in 80 ml bidest. Wasser gelöst. Der Ansatz wurde mit 5 M KOH auf pH 8,5 eingestellt und anschließend mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

PNZ-Cl (50 mM)

Um eine Lösung mit der Konzentration von 50 mM herzustellen, wurden 0,539 g des Reagenzes in 50 ml MeCN gelöst. Die Lösung wurde bei -18 ° C aufbewahrt.

Glycin-Lösung (200 mM)

Zur Herstellung einer 200 mM Glycinlösung wurden 750 mg Glycin in 50 ml bidest. Wasser gelöst.

2.3.3.3 Eluenten für PNZ-Cl-Derivate

Acetatpufferstammlösung

Für die Eluenten A und C, jeweils 0,1 M Acetatpuffer, wurde eine Acetatstammlösung (1 M) hergestellt. Jeweils 60,24 g Essigsäure wurden mit 900 ml bidest. Wasser versetzt und mit 5 M NaOH auf pH 6,1 bzw. auf pH 4,3 eingestellt. Danach wurde mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt. Ein 0,1 M Acetatpuffer wurde durch Verdünnung der 1 M Acetatstammlösung mit bidest. Wasser im Verhältnis 1:10 hergestellt.

Eluent A (0,1 M Acetatpuffer, pH 6,1); **Eluent B** (Acetonitril 100 %); **Eluent C** (0,1 M Acetatpuffer, pH 4,3)

2.3.4 Herstellung von Lösungen und Reagenzien für GC

2.3.4.1 Aminosäuren-Standardgemisch

Es wurde ein Standard H verwendet. Zu 1 ml von Standard H wurden 2,5 μmol L-Nle in einen 25 ml Spitzkolben gegeben und das Gemisch am Rotationsverdampfer im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Rückstand wurde mit 1 ml MeOH in ein "Reacti-Vial" überführt und wie in Kap. 3.3.3.1 und 3.3.3.2 beschrieben derivatisiert.

2.3.4.2 Reagenzien für PFPA-Derivate

Zur Herstellung der 2,5 M HCl in 2-Propanol wurde Acetylchlorid unter Eiskühlung zu 2-Propanol im Verhältnis 1:4 zugegeben. Zur Herstellung der BHT-Lösung (Antioxidant) wurden 10 mg 2,6 Di-*tert.*-butyl-*p*-kresol in 1 ml 2-Propanol gelöst.

2.3.4.3 Mobile Phase für GC

Bei der GC-Bestimmung wurde als mobile Phase Helium 4,6 verwendet.

2.4 Herkunft der Probenmaterialien

2.4.1 Sojabohnen und Sojabohnenkoji

Es wurden Sojabohnen und Sojabohnenkoji untersucht, welche als Hauptrohstoffe zur Herstellung von fermentierten Sojasaucen, Miso und Peppertonipasten dienen. Die Rohstoffe stammten aus dem örtlichen Lebensmitteleinzelhandel.

2.4.2 Sojasaucen

Es wurden zwei unterschiedliche Gruppen von Sojasaucen untersucht. Die fermentierten Sojasaucen wurden exklusiv aus Sojabohnenkoji nach traditioneller Rezeptur selbst hergestellt (siehe Kap. 1.3.2). Die gemischten Sojasaucen wurden durch Verschnitt mit unterschiedlichem Anteil von Hydrolysat und fermentierten Saucen hergestellt (siehe Kap. 1.3.2.2) und stammten aus dem örtlichen Lebensmitteleinzelhandel in Korea. In Tabelle 2-1 sind die Eigenschaften der Produkte dargestellt.

Tab. 2-1: Probenbezeichnungen und Charakteristika der Sojasaucen

Soja-saucen	Rohstoffe	Spezifikation	TM ¹⁾ (%)	Dichte ²⁾ (kg/l)
Sojasauce A1	SK	3 Mon. fermentiert	29,2	1,21
Sojasauce A2	SK	3 Mon. fermentiert	33,1	1,21
Sojasauce A3	SK	4 Mon. fermentiert	34,9	1,25
Sojasauce A4	SK	5 Mon. fermentiert	22,2	1,16
Sojasauce A5	SK	6 Mon. fermentiert	27,9	1,25
Sojasauce A6	SK	6 Mon. fermentiert	31,4	1,21
Sojasauce B1	SB	100 % Säurehydrolysat	54,2	1,47
Sojasauce B2	SK, WK	15:85 ³⁾ gemischt	29,4	1,20
Sojasauce B3	SK, WK	20:80 gemischt	28,1	1,15
Sojasauce B4	SK, WK	30:70 gemischt	30,3	1,22
Sojasauce B5	SK, WK	50:50 gemischt	25,9	1,15

A1-A6 fermentierte Sojasaucen, nach traditioneller Rezeptur selbst hergestellt; B1-B5 gemischte Sojasaucen, B1 nach industriellem Verfahren hydrolysiert; ^{1), 2)} Angaben aus eigener Messung; ¹⁾ Trockenmasse: nach Seesand-Methode [143]; ²⁾ nach gravimetrischer Methode; ³⁾ Mengenverhältnis zw. fermentierter und säurehydrolysiertes Sojasaucen (v/v); SK: Sojabohnenkoji; SB: Sojabohnen; WK: Weizenkoji

2.4.3 Miso

Es wurden zwei unterschiedliche Gruppen von Miso untersucht. Die Misoproben der Serie A (Sojabohnenmiso) wurden ausschließlich mit Sojabohnen und -koji nach traditioneller Rezeptur selbst hergestellt. Die Proben der Serie B (Weizenmiso) wurden mit Sojabohnenkoji unter Zusatz von unterschiedlichen Anteil von Weizen hergestellt (siehe Kap. 1.3.3) und stammten aus dem örtlichen Lebensmitteleinzelhandel in Korea. In Tabelle 2-2 sind die Eigenschaften der untersuchten Misoproben dargestellt und nach dem Sojabohnenanteil und dem Fermentationsalter angeordnet.

Tab. 2-2: Probenbezeichnungen und Charakteristika von Miso

Probe	Zutaten	Spezifikation
Miso A1	SB, SK	4 Mon. fermentiert
Miso A2	SB, SK	4 Mon. fermentiert
Miso A3	SB, SK	5 Mon. fermentiert
Miso A4	SB, SK	6 Mon. fermentiert
Miso B1	SK 23,0 % ¹⁾ , WZ 14,4 %	2-3 Mon. fermentiert
Miso B2	SK 28,3 %, WZ 2,2 %	2-3 Mon. fermentiert
Miso B3	SK 31,0 %, WZ 11,3 %	2-3 Mon. fermentiert
Miso B4	SK 48,9 %, WZ 5,0 %	2-3 Mon. fermentiert

A1-A4 Sojabohnenmiso, nach traditioneller Rezeptur selbst hergestellt; B1-B4

Weizenmiso; SB: Sojabohnen; SK: Sojabohnenkoji; WZ: Weizen; ¹⁾ m/m

2.4.4 Pepperonipasten

Es wurden zwei verschiedene Gruppen von Pepperonipasten untersucht. Die Proben der Serie A (Reispepperonipasten) wurden mit Sojabohnenkoji und Reis, nach traditioneller Rezeptur selbst hergestellt. Die Proben der Serie B (Weizenpepperonipasten) wurden mit Sojabohnenkoji unter Zusatz von Weizen und Reis hergestellt (siehe Kap. 1.3.3), und stammten aus dem örtlichen Lebensmitteleinzelhandel in Korea. In Tabelle 2-3 sind die Eigenschaften der untersuchten Pepperonipasten dargestellt und nach dem Weizenanteil und Fermentationsalter angeordnet.

Tab. 2-3: Probenbezeichnungen und Charakteristika von Pepperonipasten

Probe	Zutaten	Spezifikation
Pepperonipaste A1	SK, Reis	4 Mon. fermentiert
Pepperonipaste A2	SK, Reis	4 Mon. fermentiert
Pepperonipaste A3	SK, Reis	5 Mon. fermentiert
Pepperonipaste A4	SK, Reis	6 Mon. fermentiert
Pepperonipaste B1	SK, Klebreis 16,4 % ¹⁾	2-3 Mon. fermentiert
Pepperonipaste B2	SK, WZ 16,5 %, Reis	2-3 Mon. fermentiert
Pepperonipaste B3	SK, WZ 17,0 %, Reis	2-3 Mon. fermentiert
Pepperonipaste B4	SK, WZ 27,5 %, Klebreis	2-3 Mon. fermentiert

A1-A4 Reispepperonipasten, nach traditioneller Rezeptur selbst hergestellt; B1-B4 Weizenpepperonipasten; SK: Sojabohnenkoji; WZ: Weizen; ¹⁾ m/m

2.4.5 Sake

Die untersuchten Sakeproben sind in Tabelle 2-4 dargestellt und stammten aus dem örtlichen Lebensmitteleinzelhandel in Korea.

Tab. 2-4: Probenbezeichnungen und Charakteristika der Sake

Probe	Zutaten	Spezifikation
Sake A1	Weizenkoji, Reis	Alkoholgehalt 14 % ¹⁾ , 2 Jahre alt
Sake A2	Weizenkoji, Reis	Alkoholgehalt 15 %, 2 Jahre alt
Sake A3	Weizenkoji, Reis	Alkoholgehalt 14 %, 5 Jahre alt

¹⁾ Vol %

2.4.6 Fischsaucen

Die untersuchten Fischsaucen sind in Tabelle 2-5 dargestellt und stammten aus dem örtlichen Lebensmitteleinzelhandel in Korea.

Tab. 2-5: Probenbezeichnungen und Charakteristika von Fischsaucen

Probe	Zutaten	Spezifikation
Fischsauce A1	Fischextrakt 78,0 % ¹⁾ , Salz 22,0 % ²⁾	Handelswaren
Fischsauce A2	Fischextrakt 80,0 %, Natriumglutamat	Handelswaren
Fischsauce A3	Fischextrakt 80,0 %, Salz 20,0 %	Handelswaren
Fischsauce A4	Fischextrakt 99,55 %, Natriumglutamat	Handelswaren

^{1), 2)} m/m

2.5 Aufarbeitung der Proben zur Analyse mittels HPLC und GC

2.5.1 Aufarbeitung zur Analyse der Aminosäuren mittels HPLC

2.5.1.1 Fettfreie Proben: Sojasaucen, Sake

Zur Analyse wurde jede Probe nach dem gleichen Arbeitsschema zweimal aufgearbeitet. Die Aufarbeitungen der fettfreien Proben sind in Abbildung 2-1 als Fließdiagramm dargestellt. Von den Sojasaucen wurden nach Zugabe von jeweils 100 µl internem Standard Nva (1 mM) und Sar (1 mM) für achirale AS-Analyse sowie L-Abu (100 mM) für chirale Analyse mit 0,01 M HCl auf 10 ml verdünnt und anschließend bei 3500 x g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4 M HCl auf pH 2,3 eingestellt und 1 ml davon über einen mit DOWEX 50W X8-400 gefüllten Kationenaustauscher aufgereinigt (siehe Kap. 2.5.3). Im Falle der Sake wurde nach dem selben Schema wie Sojasaucen ohne Zentrifugierung aufgearbeitet.

2.5.1.2 Fetthaltige Proben: Sojabohnen, Sojabohnenkoji, Miso, Pepperonipasten, Fischsaucen

Etwa 1 g Probe und 30 ml 70 % Ethanol wurden 45 min gerührt und anschließend bei 3500 x g für 20 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in einen 100 ml Schütteltrichter überführt und 3 mal mit je 30 ml n-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden verworfen und der wäßrige Rückstand am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 0,01 M HCl gelöst und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4 M HCl auf pH 2,3 eingestellt und über einem mit DOWEX 50W X8-400 gefüllten Kationenaustauscher aufgereinigt (siehe Kap. 2.5.3). Die Aufarbeitungen der fetthaltigen Proben sind in Abbildung 2-2 als Fließdiagramm dargestellt.

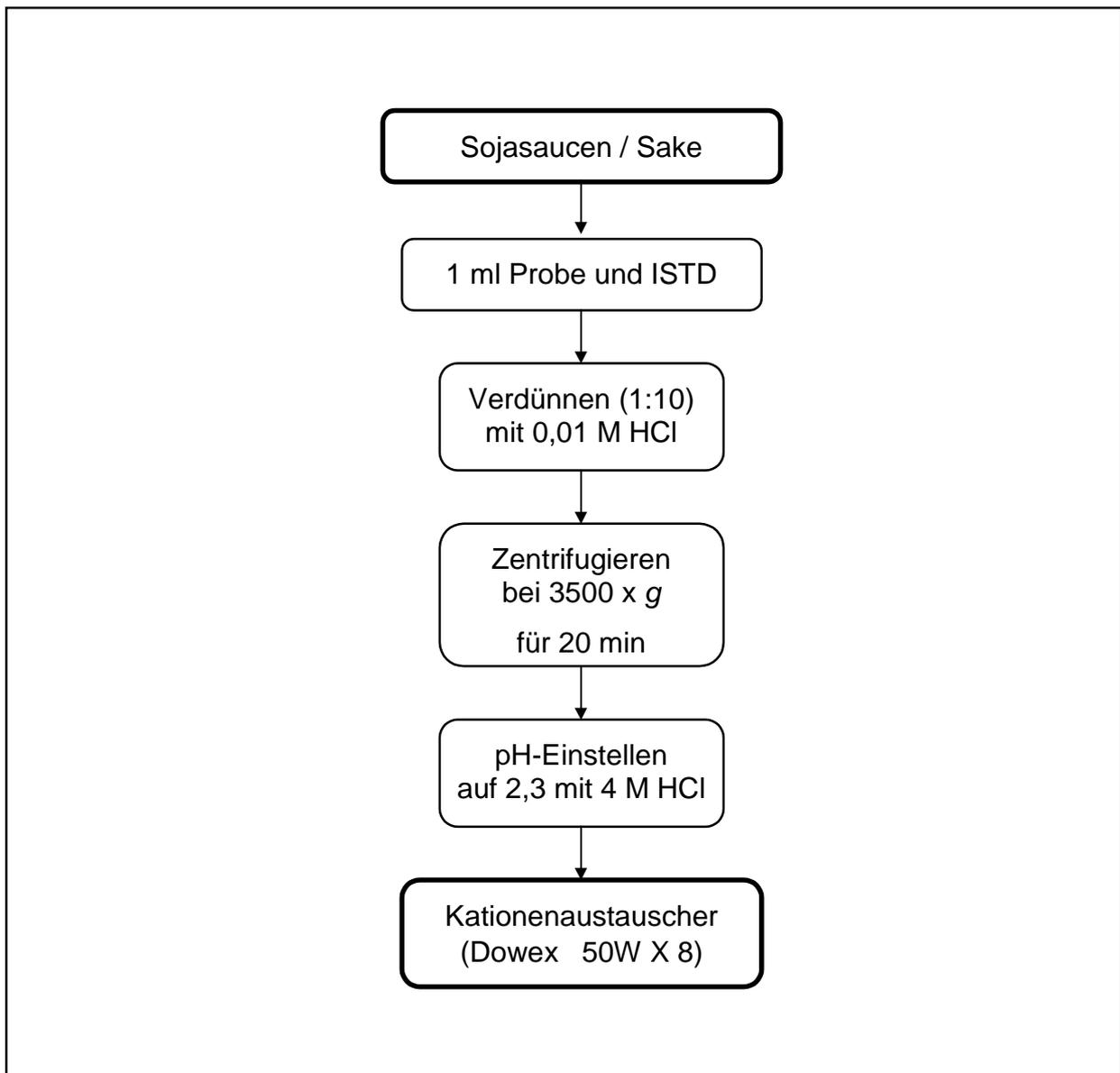


Abb. 2-1: Schema der Aufarbeitung der fettfreien Proben

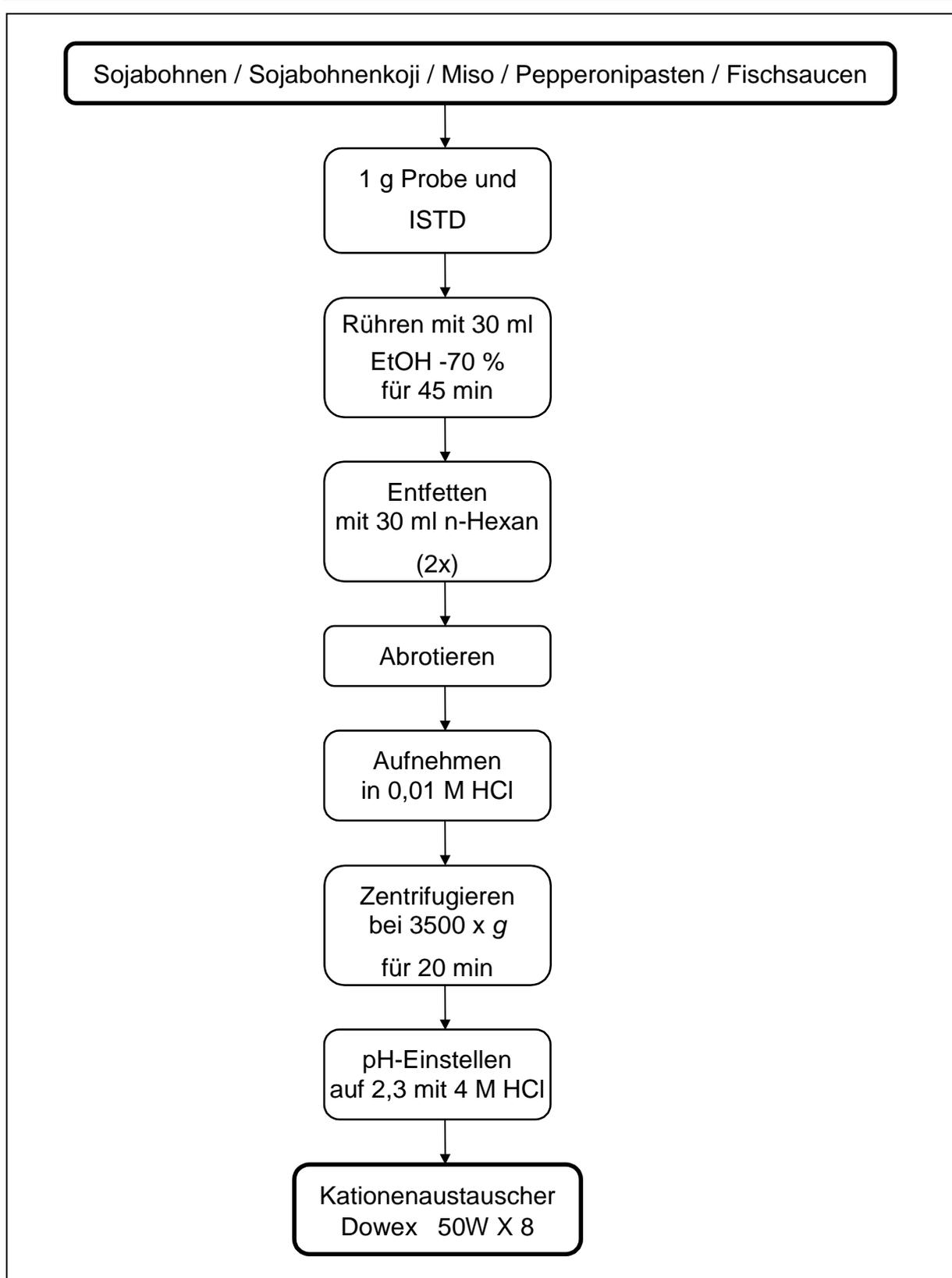


Abb. 2-2: Schema der Aufarbeitung der fetthaltigen Proben

2.5.2 Aufarbeitung der Proben zur Analyse mittels GC

Es wurde als interner Standard 100 µl L-Nle (10 mM) verwendet. Das weitere Vorgehen entspricht den Angaben im Abschnitt 2.4.2.1. Nach Aufreinigung über einem Kationenaustauscher wurde das Eluat am Rotationsverdampfer bis zur Trockene im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in 0,1 M HCl gelöst und in ein "Reactive Vial" überführt. Anschließend wurde unter Stickstoffstrom zur Trockene eingeengt und dann die Probe der Derivatisierung zugeführt.

2.5.3 Isolierung von freien Aminosäuren mittels Ionenaustauschchromatographie

Der Ionenaustausch wurde mit einem stark sauren Kationenaustauscherharz vorgenommen: Dowex 50W X 8, 200-400 mesh, H⁺-Form

Regenerierung

Der Kationenaustauscher wurde mit den jeweils fünffachen Volumina der folgenden Spülflüssigkeiten in einem Chromatographierohr vorbereitet:

1. Bidest. Wasser
2. 2 M NaOH
3. Bidest. Wasser
4. 2 M HCl
5. Bidest. Wasser
6. Aufbewahrung in braunen Flaschen unter 0,1 M HCl

Ionenaustauschchromatographie (Durchführung)

Die Kationenaustauschersäule wurde zuerst zur Neutralisierung des Säulefüllmaterials mit 1 ml bidest. Wasser fünfmal gewaschen. Die aufgearbeiteten Probenlösungen einschließlich der pH-Einstellung auf 2,3 wurden dann jeweils auf die Säule (5 x 1 cm Bettvolumen) gegeben. Nach fünfmaligem Waschen mit 1 ml bidest. Wasser wurden die gebundenen Aminosäuren mit ca. 5 ml 4 M Ammoniaklösung in einen

100 ml Rundkolben eluiert und am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei einer Temperatur von 40 ° C zur Trockene eingengt. Der trockene Aminosäurenrückstand wird anschließend in 5 ml MKB-Gemisch aufgenommen und Aliquote hiervon der Aminosäurenanalyse mittels HPLC zugeführt. Für die Bestimmung mittels GC wurde der Rückstand in 1 ml 0,1 M HCl aufgenommen, nach Überführung in ein "Reactive Vial" unter Stickstoffstrom zur Trockene eingengt und dann der Derivatisierung zugeführt.

2.5.4 Aufarbeitung der Proben zur Analyse der biogenen Amine mittels HPLC

1 ml Probe wurde nach Zugabe von 50 µl Dhx (10 µM) als interner Standard und 0,5 ml EtOH zur Verbesserung der Proteinausfällung mit 0,1 M HCl auf 10 ml aufgefüllt (Verdünnung 1:10). Danach wurde bei 3500 x g für 20 min zentrifugiert und aus diesem Überstand 20 µl für die Derivatisierung entnommen.

3 OPTIMIERUNG DER HPLC- UND GC-METHODEN

3.1 Vorsäulenderivatisierung mit OPA zur achiralen und chiralen Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC

Das selbst nicht fluoreszierende *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) bildet mit primären Aminoverbindungen in Gegenwart einer Thiolverbindung im alkalischen Milieu ein fluoreszierendes Isoindolringsystem (Abb. 3-1). Bei der Reaktion wird der Aminostickstoff in einen Pyrrolring umgewandelt und daher können sekundäre Amine wie z.B. Pro und Hyp nicht mit OPA reagieren [71,144-146]. Zur quantitativen Aminosäurenanalytik kann das OPA-Reagenz durch eine geeignete Variation der achiralen und chiralen Thiolverbindungen vielseitig verwendet werden. Die Verwendung von OPA zur AS-Analyse mittels HPLC erfolgt meist in Verbindung mit einer Vorsäulenderivatisierung an RP-18-Umkehrphasen [147]. Es wurde auch die Trennung der AS an Ionenaustauschern mittels HPLC mit einer Fluoreszenzderivatisierung im Nachsäulen-Verfahren empfohlen. Dieses Verfahren ist jedoch aufwendiger [148].

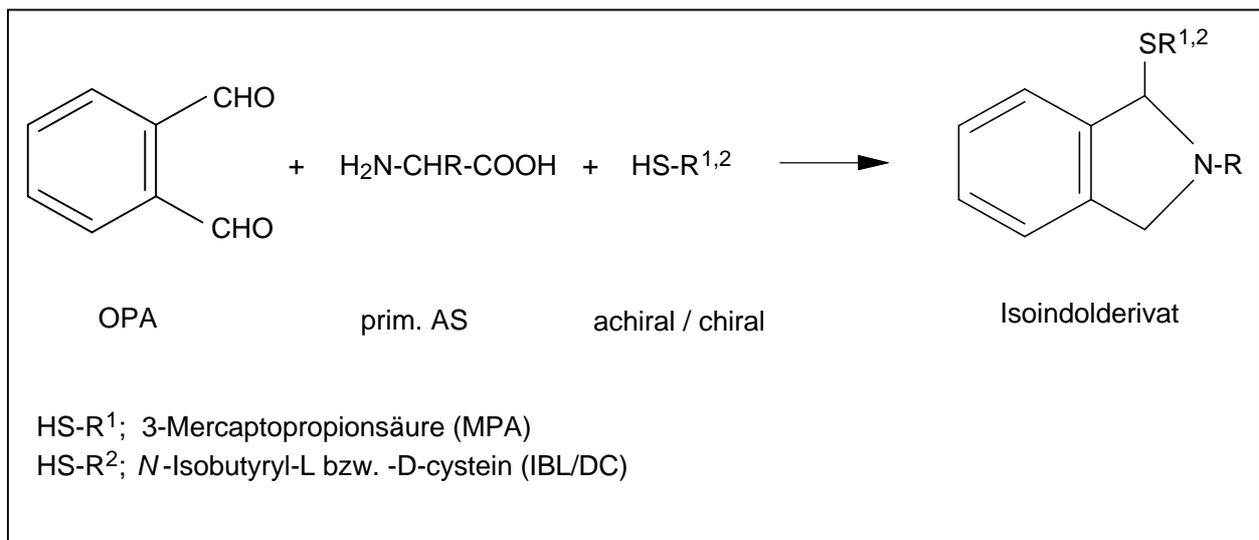


Abb. 3.1: Reaktionsschema der primären AS mit OPA in Gegenwart von achiralen und chiralen Thiolverbindungen

Ein wichtiger Vorteil der Vorsäulenderivatisierung mit OPA ist, daß das überschüssige Reagenz nicht aus der Reaktionsmischung entfernt werden muß, da es selbst nicht fluoresziert [76]. Der Einführung der Derivatisierung von AS mit OPA standen in den letzten Jahren Probleme der unterschiedlichen Bildungsgeschwindigkeit und der Stabilität der OPA-Derivate entgegen. Es konnte in der Folgezeit durch eine vollautomatisierte, dadurch gut reproduzierbare Derivatisierungsprozedur beseitigt werden.

Als Thiolverbindung zur achiralen Bestimmung von AS werden häufig 2-Mercaptoethanol (ME) oder 3-Mercaptopropionsäure (MPA) eingesetzt [71,149,150]. Zur Lösung des Problems der Nichterfassung von sekundären AS haben PALMERINI et al. [151] vorgeschlagen, alle primären AS mit OPA ohne Zusatz von Thiolverbindungen umzusetzen. Dabei entstehen nicht fluoreszierende Derivate. Anschließend werden sekundären AS mit 4-Chlor-7-nitrobenzo-furazan (NBD-Cl) zu Fluoreszenzderivaten umgesetzt, die getrennt von allen anderen AS bestimmt werden können. Diese Methode ist jedoch wegen geringerer Effektivität gegenüber der OPA-Derivate nicht empfehlenswert [146].

Die Vorsäulenderivatisierung mit OPA in Kombination von 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC-Cl) bietet eine schnelle und empfindliche Methode zur simultanen Analyse von primären und sekundären AS [76,152,154]. FMOC-Cl, ein Ester der Chlorameisensäure, reagiert schnell und quantitativ mit einem Amin zu einer Urethanverbindung und somit sind sowohl primäre als auch sekundäre Amine durch FMOC-Cl derivatisierbar [73] (Abb. 3-2), was den bedeutendsten Vorteil gegenüber der OPA-Derivatisierung darstellt. Ein Nachteil der FMOC-Methode ist jedoch, daß das Reagenz selbst fluoresziert und als relativ großer Reagenzpeak im Elutionsbereich der AS-Derivate erscheint. Eine Kombination beider Methoden durch automatisierte, aufeinanderfolgende Vorsäulenderivatisierung vereinigt die Vorteile beider Methode.

OPA reagiert zuerst in Gegenwart einer achiralen Thiolverbindung, z.B. MPA mit primären AS. Nach der nachfolgenden Umsetzung mit FMOC-Cl für sekundäre AS werden OPA/MPA-FMOC-AS-Derivate an Umkehrphasen mittels HPLC getrennt. Als bisher beste Gesamttrennung demonstrierte SCHUSTER [152] eine kombinierte HPLC-Methode nach der Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl, indem

insgesamt 36 AS einschließlich sekundären AS in einem chromatographischen Lauf getrennt werden konnten.

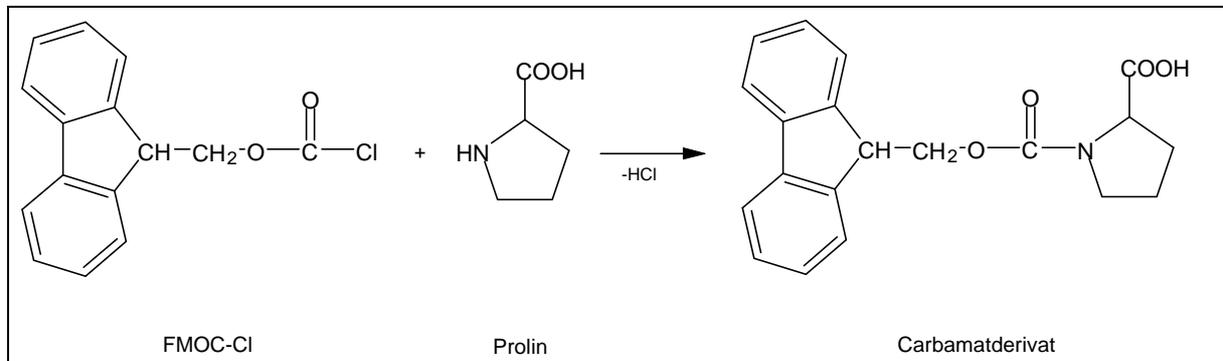


Abb. 3.2: Reaktionsschema der AS mit FMOC-Cl zur Erfassung von sekundären AS (am Beispiel Pro)

Die erste Beobachtung von ASWAD [155], daß DL-Asn nach der Derivatisierung mit OPA und *N*-Acetyl-L-cystein (Ac-L-Cys) als chiralem Thiol zu diastereomeren Isoindolderivate umgewandelt und mittels HPLC getrennt wurden, brachte verschiedene Varianten von chiralen Thiolverbindung zur AS-Analytik zur breiten Anwendung (indirekte Methode) [156-158]. Als weitere chirale Thiolvarianten werden *tert*-Butyloxycarbonyl-L-cystein (Boc-Cys) [159,160], *N*-Acetyl-L-penicillamin (NAP) [161] sowie einige Thiozucker z.B. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (TATG) [89], 1-Thio- β -D-glucose [162], 1-Thio- β -D-galactose [163] oder 1-Thio- β -D-mannose eingesetzt [164].

BRÜCKNER et al. [165-167] untersuchte eine Reihe der *N*-Acyl-Cystein-Homologe, von *N*-Acetyl bis *N*-Octanoyl-L-cystein, zur Eignung als chiralen Reagenz zur enantiomeren AS-Analytik. Darüber hinaus gelang die bisher beste Gesamttrennung von 17 proteinogenen AS und ihrer entsprechenden D-Enantiomere sowie Gly und Gaba nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA und *N*-Isobutyryl-L- bzw. D-cystein [166].

3.2 Achirale OPA/MPA-FMOC-Cl-Methode mittels HPLC

SCHUSTER [152] demonstrierte eine kombinierte Methode mit einem HPLC-System von Hewlett-Packard HP 1090 Series M, in der überwiegend Proteinhydrolysate und physiologische Flüssigkeiten nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl analysiert wurden.

Für die achirale Aminosäurenanalytik wurde im Rahmen dieser Arbeit eine standardisierte und vollautomatisierbare Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl auf der Basis der Methode von SCHUSTER [152] und durch eigene systematische Messungen bei HPLC-System LaChrom von Merck Hitachi optimiert. Während der Optimierung der eingesetzten Methode wurden einzelne chromatographische Daten modifiziert und dadurch gelang eine zusätzliche Trennung einiger Aminosäuren. Die Unterschiede werden im Abschnitt 5.2.6 ausführlich dargestellt.

3.2.1 Optimierung der chromatographischen Trennung

3.2.1.1 Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren

Die Derivatisierung der AS erfolgte unter Verwendung eines programmierbaren Autosamplers (Abb. 3-3). Im ersten Schritt der Derivatisierung wurde Probe bzw. Standard, Kaliumboratpuffer und OPA-MPA-Reagenz aufeinanderfolgend aufgezogen und in "Reakti-Vials" überführt. Nach dem mehrmaligen Mischen und einer Reaktionszeit von 200 Sek. wurde das zweite Derivatisierungsreagenz FMOC-Cl zugeetzt. Nach weiteren 90 Sek. wurde die Reaktion durch Zugabe einer genau abgemessenen Menge von Essigsäure gestoppt. Die Erniedrigung des pH-Wertes dient dem stabilen, optimalen Ablauf der Reaktion und zur Schonung der Säule, da auf Silika basierende Trennsäulen für alkalische pH-Wert meist nicht geeignet sind. Nach der Derivatisierung wurden 20 µl des Aliquotes der Lösung in die HPLC-Apparatur injiziert [168].

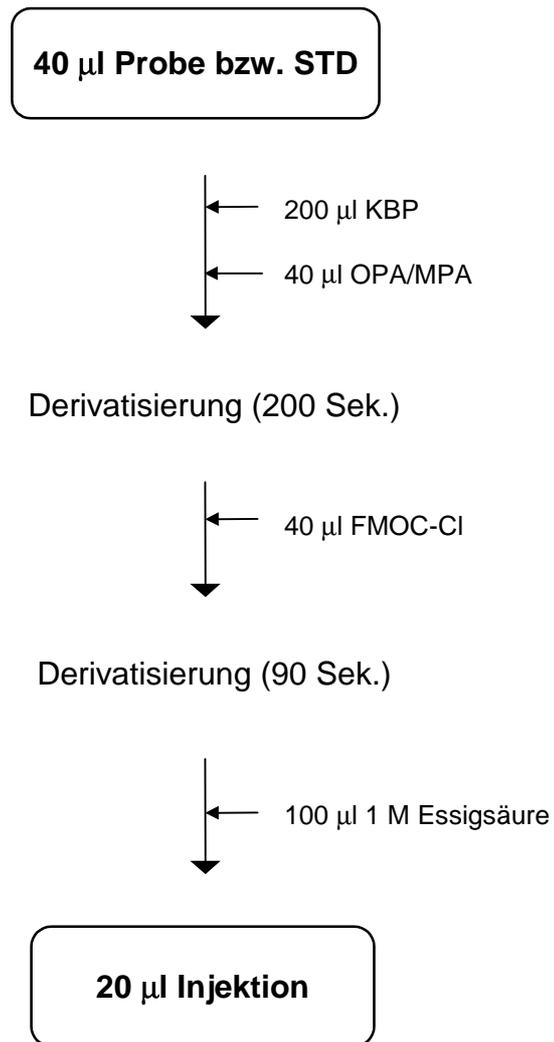


Abb. 3-3: Schema der Derivatisierung der AS mit OPA/MPA-FMOC-Cl nach SPENGLER [168] unter Verwendung eines programmierbaren Autosamplers

3.2.1.2 Chromatographische Trennung

Die Trennung der untersuchten Aminosäuren erfolgte mittels eines binären Gradientensystems auf einer NovaPak C₁₈-Säule bei einer Säulenofentemperatur von 25 °C. Das Gradientenprogramm zur Trennung der OPA/MPA-FMOC-Derivate wurde in Tabelle 3-1 dargestellt. Als Eluent A diente dabei ein Natriumacetatpuffer (0,1 M, pH 6,5) mit Zusatz von TEA. Eluent B war reines Acetonitril. Das mit diesem Gradientenprogramm erhaltene Standardchromatogramm ist in Abbildung 3-4 gezeigt.

Diese Methode ermöglicht die Trennung aller proteinogenen AS mit Ausnahme von Cyst(e)in sowie der nichtproteinogenen AS Cit, Tau, Gaba sowie Orn unter Verwendung eines Gradienten innerhalb von 70 min in einem chromatographischen Lauf. Zusätzlich wurden interne Standards Nva für primären AS und Sar für sekundären AS getrennt.

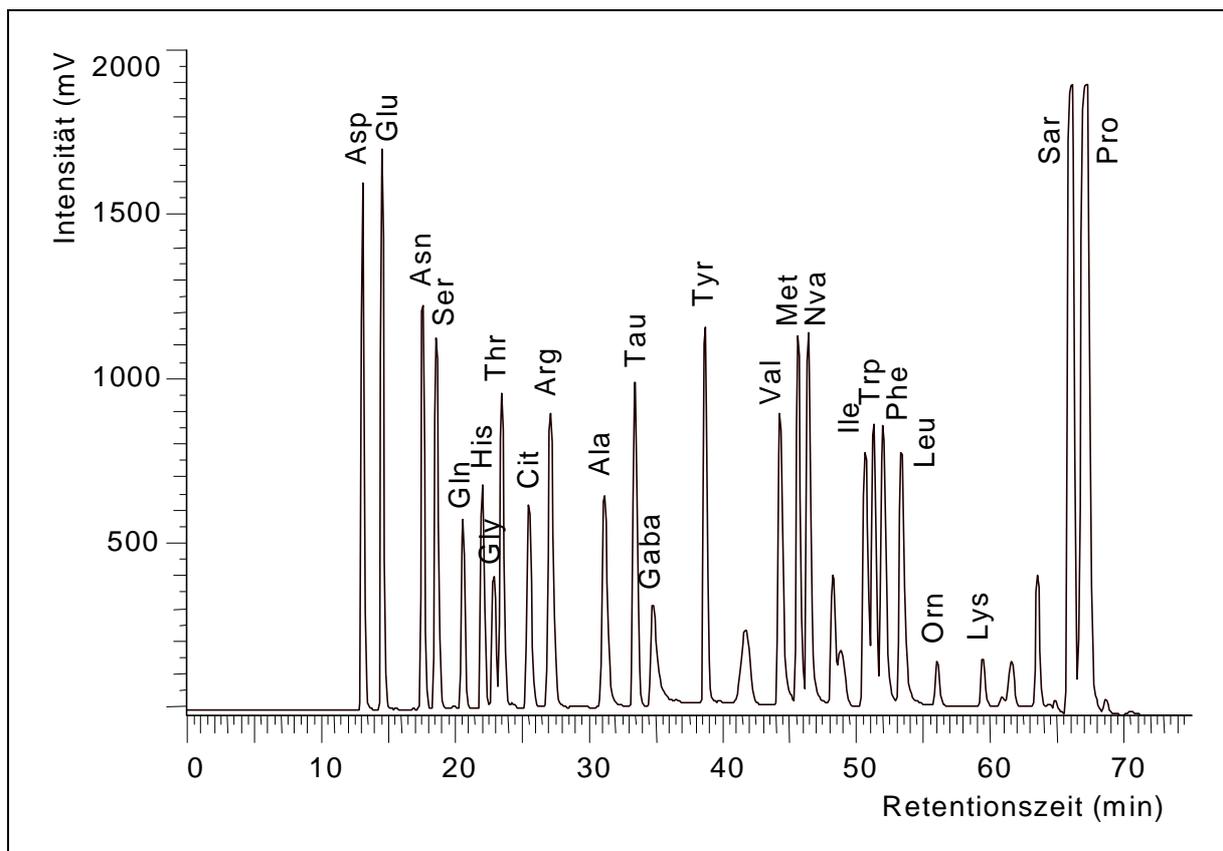


Abb. 3-4: HPLC-Chromatogramm eines Standards (100 µM) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.2.1

Tab. 3-1: Gradientenprogramm zur Trennung der OPA/MPA-FMOC-Derivate der Aminosäuren auf einer NovaPak C₁₈ RP-Säule (300 mm x 3,9 mm I.D., Waters). Eluent A: Natriumacetat (0,1 M, pH 6,5) mit Zusatz von TEA (0,044 %, v/v), Eluent B: MeCN (100 %).

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flußrate [ml/min]
0,0	100,0	0,0	0,8
6,0	100,0	0,0	0,8
8,0	95,0	5,0	0,8
17,0	92,0	8,0	0,8
25,0	92,0	8,0	0,8
30,0	88,0	12,0	0,8
42,0	82,0	18,0	0,8
55,0	78,0	22,0	0,8
60,0	73,0	27,0	0,8
75,0	73,0	27,0	0,8
77,0	0,0	100,0	0,8
82,0	0,0	100,0	0,8
82,1	100,0	0,0	0,8
87,0	100,0	0,0	0,8

3.2.1.3 Detektion der Aminosäuren

Die Fluoreszenzspektren des Reagenzes bzw. seiner Derivate ergaben Maxima bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm für OPA/MPA-Derivate und bei 263 und 312 nm für FMOC-Cl. Das Detektionsprogramm des FLD ist in Tabelle 3-2 aufgezeigt.

Tab. 3-2: Detektionsprogramm des FLD für die OPA/MPA- und die FMOC-Cl-Derivate innerhalb einer Trennung

Zeit [min]	Excitation [nm]	Emission [nm]	FLD- Empfindlichkeit
0,0	330	445	low
64,0	330	445	low
65,0	263	312	low
75,0	263	312	low
76,0	330	330	low

3.2.2 Quantifizierung der Aminosäuren

Zur Quantifizierung der AS-Gehalte in den Proben wurden anhand der Injektion der fünf Standardgemische von 1; 5; 25; 50,0 sowie 200,0 μM die Regressionsgeraden ($y = ax + b$) zu jeder AS über Auswertung der jeweiligen Peakflächen bestimmt. Die Gleichungen der Regressionsgeraden und die Bestimmtheitsmaße sind in Anhang aufgeführt.

3.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze entspricht der niedrigsten Konzentration, die noch vom Blank zu unterscheiden ist. Dabei sollte das Signal zu Rausch Verhältnis mindestens 3:1 betragen, um eine Abgrenzung überhaupt möglich zu machen [169]. Die Nachweisgrenze für die OPA/MPA-FMOC-Cl liegt bei 0,06 – 1,31 pmol absolut injizierter Menge (Tab. 3-3). Die Bestimmungsgrenze wurde durch den kleinsten Kalibrierungsstandard festgesetzt. Um eine quantitative Aussage machen zu können, sollte sich das Signal zu Rausch Verhältnis mindestens 5:1 befinden. In der vorliegenden Methode wurde als Bestimmungsgrenze für jede Aminosäure 1,0 μM festgelegt.

Tab. 3-3: Nachweisgrenzen (NG) der einzelnen AS für die Analyse mittels OPA/MPA-FMOC-Cl

AS	NG [pmol]	AS	NG [pmol]	AS	NG [pmol]	AS	NG [pmol]
Asp	1,25	Gly	1,04	Gaba	0,19	Phe	0,22
Glu	0,83	Thr	0,62	Tyr	0,30	Leu	0,35
Asn	0,16	Cit	0,15	Val	1,12	Orn	0,73
Ser	0,91	Arg	0,31	Met	0,18	Lys	1,20
Gln	0,10	Ala	0,73	Ile	0,95	Pro	1,31
His	0,38	Tau	0,06	Trp	0,37		

3.3 Chirale OPA/IBL(D)C-Methode

BRÜCKNER et al. [165,166] demonstrierten unter Verwendung von OPA und *N*-Isobutyryl-L/D-Cystein (IBL/DC) als chirales Derivatisierungsreagenz und Fluoreszenzdetektor (FLD) eine gut reproduzierbare Trennung. Die Methode ermöglicht die Trennung aller proteinogenen L-Aminosäuren und der entsprechenden D-Aminosäuren sowie Glycin und dem internen Standard L-Abu mit Ausnahme von Prolin und Cyst(e)in mittels HPLC an einer konventioneller RP-18-Phase unter Verwendung eines einfachen linearen Gradienten innerhalb von 75 min in einem chromatographischen Lauf. Die Derivate der L-Enantiomere der einzelnen AS nach Derivatisierung mit OPA-IBLC eluieren hierbei ausnahmslos vor den Derivaten der D-Enantiomere (Abb. 3-5).

Bei Verwendung von IBDC anstelle von IBLC ergibt sich eine Elutionsfolgenumkehr (Abb. 3-5), welche eine Absicherung der Untersuchungsergebnisse sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht erlaubt. Die hohe Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors ermöglicht bei dieser Methode Nachweisgrenzen bis in den oberen Femtomolbereich. Der Linearitätsbereich für quantitative Bestimmungen reicht hierbei von 1 pmol bis 1 nmol [165,166], so daß bei Relativquantifizierungen der Nachweis von 0,1 % einer D-AS neben dem jeweiligen L-Enantiomer innerhalb einer Detektorverstärkungsstufe möglich ist. Bei den in den Proben vorliegenden, oft sehr unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen - vor allem zwischen den D- und

L-Enantiomeren - sind in der Regel mehrere chromatographische Läufe notwendig, um zu exakten, quantitativen Ergebnissen zu gelangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 2 HPLC-Systeme HP 1090 L von Hewlett Packard und LaChrom von Merck Hitachi für die chirale AS-Analyse nach Derivatisierung mit OPA und *N*-Isobutyryl-L/D-cystein (IBL/DC) eingesetzt. Die von BRÜCKNER et al. [165,166] entwickelte OPA/IBL(D)C-Methode wurde zuerst bei System HP 1090 L optimiert und die selbe Methode durch Modifizierung einzelner chromatographischer Parameter auf das LaChrom System übertragen. Die Unterschiede der Methoden werden in Kapitel 5.2.6 näher diskutiert.

3.3.1 HP 1090 L System

3.3.1.1 Optimierung der chromatographischen Trennungen

3.3.1.1.1 Vollautomatisierte Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren

Die Derivatisierung der AS erfolgte unter Verwendung eines programmierbaren Autosamplers. Dabei wurden 5 µl Natriumboratpuffer, 1 µl OPA/IBLC bzw. -IBDC und 1 µl Probe nacheinander aufgezogen. In der Injektionsschleife wurde die Lösung mit 5 Mischzyklen (entsprechend 3 min Derivatisierungszeit) gemischt und dann 7 µl des Aliquotes der Derivate in die HPLC-Apparatur injiziert.

3.3.1.1.2 Chromatographische Trennungen

Die Trennung der untersuchten Aminosäuren erfolgte mittels eines binären Gradientensystems auf einer Hypersil ODS2-Säule bei einer Säulenofentemperatur von 25 °C. Das Gradientenprogramm zur Trennung der OPA/IBL(D)C-Derivate wurde in

Tabelle 3-4 dargestellt. Als Eluent A diene dabei ein Natriumacetatpuffer (23 mM, pH 6,05). Eluent B bestand aus einem Gemisch von MeOH und MeCN (12/1, v/v). Die mit diesem Gradientenprogramm erhaltene Standardchromatogramme sind in Abbildung 3-5 gezeigt.

Tab. 3-4: Gradientenprogramm zur Trennung der OPA/IBL(D)C-Derivate der Aminosäuren auf einer Hypersil ODS2-Säule (250 mm x 4 mm I.D. Hewlett-Packard). Eluent A: Natriumacetat (23 mM, pH 6,05), Eluent B: MeOH/MeCN (12/1,v/v).

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flußrate [ml/min]
0,0	100,0	0,0	1,0
75,0	46,5	53,5	1,0
76,0	0,0	100,0	1,0
85,0	0,0	100,0	1,0
86,0	100,0	0,0	1,0
90,0	100,0	0,0	1,0

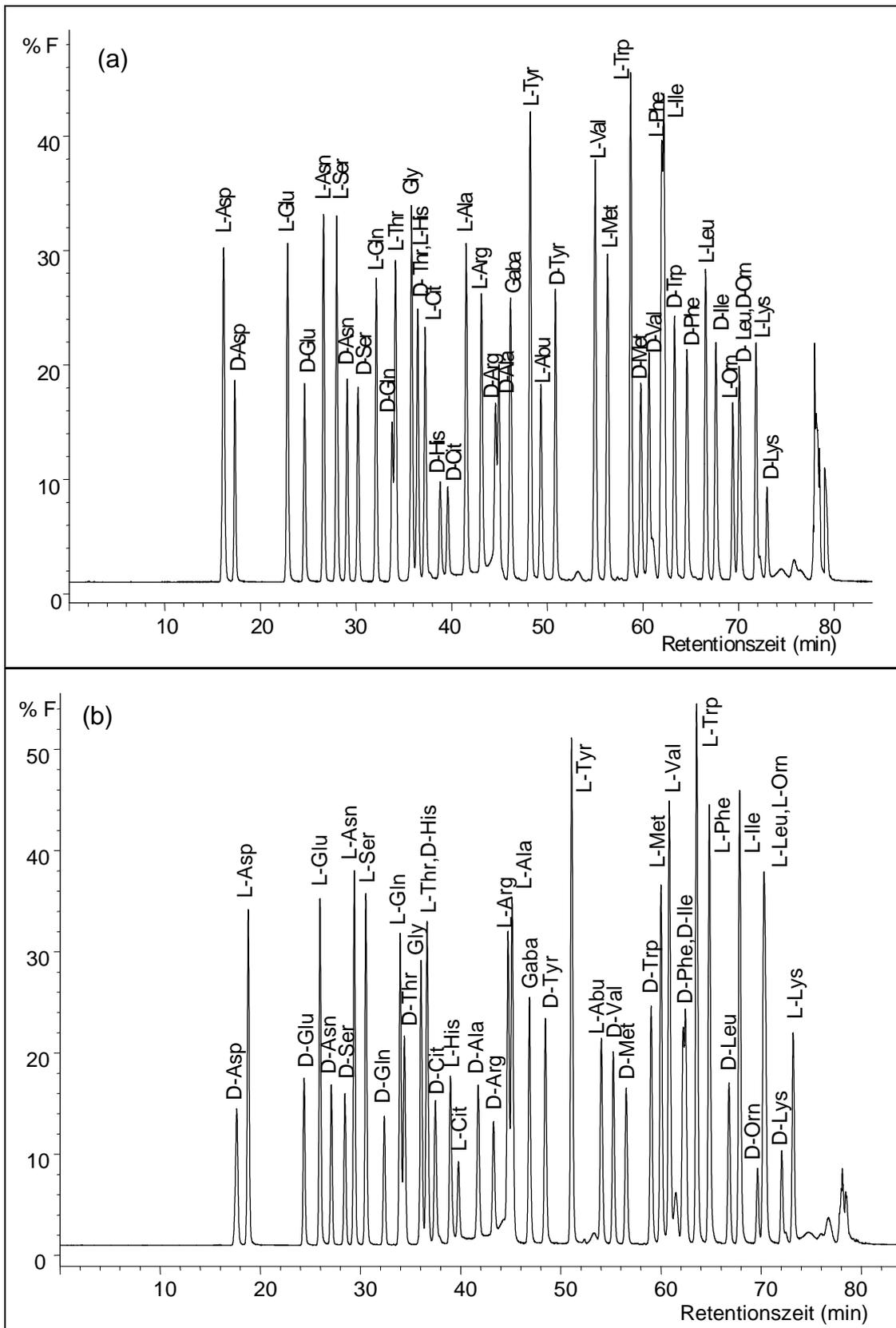


Abb. 3-5: HPLC-Chromatogramm von Standards (L:D=2:1 bei IBLC, D:L=1:2, Cit 1:1 bei IBDC) nach Derivatisierung mit (a) OPA/IBLC und (b) OPA/IBDC mittels HP 1090. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.3.2

3.3.1.1.3 Detektion der Aminosäuren Chromatographische Trennungen

Die Fluoreszenzspektren des Reagenzes bzw. seiner Derivate ergaben Maxima bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm. Als Signalverstärkung wurde die Einstellung PMT Gain 10 gewählt.

3.3.1.2 Quantifizierung der Aminosäuren

Zur Quantifizierung der AS-Gehalte in den Proben wurden anhand der Injektion der fünf Standardgemische von 5, 10; 50; 100 sowie 200 μM die Regressionsgeraden ($y = ax + b$) zu jeder AS über Auswertung der jeweiligen Peakflächen bestimmt. Die Gleichungen der Regressionsgeraden und die Bestimmtheitsmaße sind in Anhang aufgeführt.

3.3.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze der einzelnen AS (siehe Kap. 3.2.3) in absolut injizierter Stoffmenge [pmol] sind für die OPA/IBLC- bzw. IBDC-Methoden in der Tabelle 3-5 dargestellt. In der vorliegenden Methode wurde als Bestimmungsgrenze für jede Aminosäure 5,0 μM festgelegt.

Tab. 3-5: Nachweisgrenze (NG) der einzelnen AS für die Analyse mittels OPA/IBLC bzw. OPA/IBDC bei System HP 1090

AS	NG [pmol]		AS	NG [pmol]	
	IBLC	IBDC		IBLC	IBDC
L-Asp	3,00	2,56	D-Ala	2,74	2,81
D-Asp	2,82	3,08	Gaba	3,03	2,65
L-Glu	2,60	2,44	L-Tyr	2,51	2,38
D-Glu	2,79	2,79	D-Tyr	2,66	2,70
L-Asn	2,63	2,46	L-Val	2,40	2,44
D-Asn	2,61	3,41	D-Val	2,85	2,74
L-Ser	3,36	1,99	L-Met	2,73	2,54
D-Ser	2,76	2,57	D-Met	2,68	2,80
L-Gln	2,63	2,60	L-Trp	2,33	2,39
D-Gln	2,89	3,58	D-Trp	2,40	2,64
L-Thr	2,40	-	L-Phe	3,00	2,44
D-Thr	-	2,63	D-Phe	2,63	-
Gly	2,66	1,93	L-Ile	-	2,52
L-His	-	2,63	D-Ile	2,65	-
D-His	2,83	-	L-Leu	3,39	-
L-Cit	2,66	2,78	D-Leu	-	2,74
D-Cit	2,83	2,78	L-Orn	2,75	-
L-Arg	2,70	2,65	D-Orn	-	3,00
D-Arg	2,79	2,89	L-Lys	3,23	3,00
L-Ala	2,60	2,45	D-Lys	2,89	3,00

- aufgrund der Überschneidungen nicht bestimmbar

3.3.2 LaChrom System

3.3.2.1 Optimierung der chromatographischen Bedingungen

3.3.2.1.1 Vollautomatisierte Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren

Die Derivatisierung der AS erfolgte unter Verwendung eines programmierbaren Autosamplers (Abb. 3-5). Im ersten Schritt der Derivatisierung wurde zuerst die analysierende Probe bzw. Standard, Kaliumboratpuffer, OPA und IBLC- bzw. IBDC-Reagenz hintereinander aufgezogen und in Reaktions-Vial überführt. Nach mehrmaligen Mischen und einer Reaktionszeit von 120 Sek. wurde 20 μl des Aliquotes der Lösung in die HPLC-Apparatur injiziert.

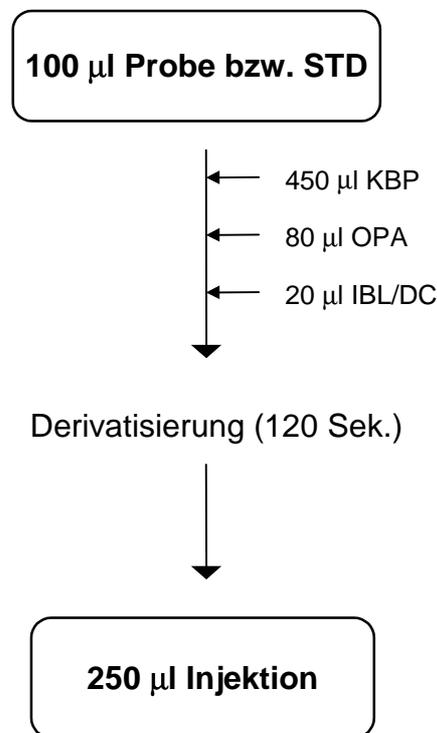


Abb. 3-6: Schema der Derivatisierung der AS mit OPA/IBL(D)C unter Verwendung eines programmierbaren Autosamplers

3.3.2.1.2 Chromatographische Trennungen

Die Trennung der untersuchten Aminosäuren erfolgte mittels eines binären Gradientensystems auf einer NovaPak C₁₈-Säule bei einer Säulenofentemperatur von 25 °C. Das Gradientenprogramm zur Trennung der OPA/IBL(D)C-Derivate wurde in Tabelle 3-6 dargestellt. Als Eluent A diente dabei ein Natriumacetatpuffer (20 mM, pH 6,15). Eluent B bestand aus einem Gemisch von MeOH und MeCN (12/1, v/v). Die mit diesem Gradientenprogramm erhaltene Standardchromatogramme sind in Abbildung 3-7 gezeigt.

Tab. 3-6: Gradientenprogramm zur Trennung der OPA/IBL(D)C-Derivate der Aminosäuren auf einer NovaPak C₁₈ RP-Säule (300 mm x 3,9 mm I.D. Waters). Eluent A: Natriumacetat (20 mM, pH 6,15), Eluent B: MeOH/MeCN (12/1, v/v).

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flußrate [ml/min]
0,0	100,0	0,0	0,05
0,1	100,0	0,0	1,0
78,0	49,0	51,0	1,0
83,0	49,0	51,0	1,0
83,1	0,0	100,0	1,0
93,0	0,0	100,0	1,0
93,1	100,0	0,0	1,0
98,0	100,0	0,0	1,0
98,1	100,0	0,0	0,05

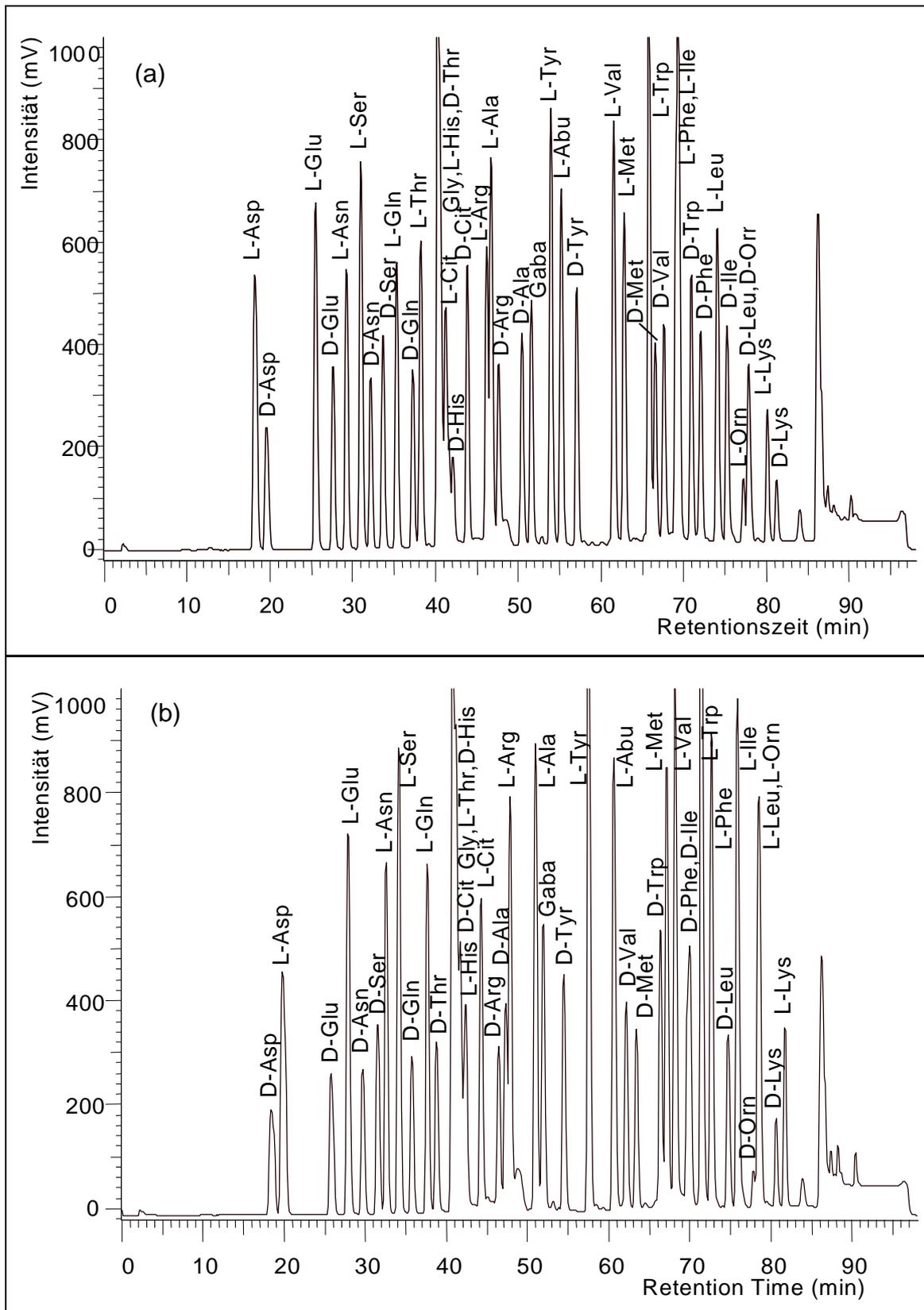


Abb. 3-7: HPLC-Chromatogramme von Standards (L:D=2:1, Cit 1:1) nach Derivatisierung mit (a) OPA/IBLC und (b) OPA/IBDC mittels HPLC-System LaChrom . Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.3.2

3.3.2.1.3 Detektion der Aminosäuren

Die Fluoreszenzspektren des Reagenzes bzw. seiner Derivate ergaben Maxima bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm. Als Signalverstärkung wurde die Empfindlichkeit bei *low* eingestellt.

3.3.2.2 Quantifizierung der Aminosäuren

Zur Quantifizierung der AS-Gehalte in den Proben wurden anhand der Injektion der sechs Standardgemische von 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0, sowie 20,0 µM die Regressionsgeraden ($y = ax + b$) zu jeder AS über Auswertung der jeweiligen Peakflächen bestimmt. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Fluoreszenz wurden bei diesem LaChrom System niedrigere Standardkonzentrationen als die bei HP System gewählt. Die Gleichungen der Regressionsgeraden und die Bestimmtheitsmaße sind in Anhang aufgeführt.

3.3.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze der einzelnen AS (siehe Kap. 3.2.3) in absolut injizierter Stoffmenge [pmol] sind für die OPA/IBLC- bzw. IBDC-Methoden in den Tabelle 3-7 dargestellt. In der vorliegenden Methode wurde als Bestimmungsgrenze für jede Aminosäure 0,5 µM festgelegt.

Tab. 3-7: Nachweisgrenze (NG) der einzelnen AS für die Analyse mittels OPA/IBLC bzw. OPA/IBDC bei LaChrom System

AS	NG [pmol]		AS	NG [pmol]	
	IBLC	IBDC		IBLC	IBDC
L-Asp	0,21	0,13	Gaba	0,14	0,07
D-Asp	0,11	0,14	L-Tyr	0,09	0,10
L-Glu	0,15	0,08	D-Tyr	0,07	0,09
D-Glu	0,14	0,11	L-Val	0,11	0,10
L-Asn	0,22	0,21	D-Val	0,07	0,10
D-Asn	0,35	0,28	L-Met	0,08	0,10
L-Gln	0,14	0,13	D-Met	0,14	0,09
D-Gln	0,11	0,09	L-Trp	0,11	0,15
L-Thr	0,32	-	D-Trp	-0,05	0,13
D-Thr	-	0,23	L-Phe	-	0,22
Gly	-	-	D-Phe	0,07	-
L-His	-	0,17	L-Ile	-	0,17
D-His	0,14	-	D-Ile	0,14	-
L-Cit	0,11	0,11	L-Leu	0,17	-
D-Cit	0,22	0,17	D-Leu	-	0,11
L-Arg	0,24	0,09	L-Orn	0,01	-
D-Arg	0,18	0,07	D-Orn	-	0,09
L-Ala	0,27	0,10	D-Lys	0,04	0,11
D-Ala	0,09	0,16	D-Lys	0,15	0,10

- aufgrund der Überschneidungen nicht bestimmbar

3.4 *para*-Nitrobenzyloxycarbonylchlorid zur Bestimmung von biogenen Aminen mittels HPLC

p-Nitrobenzyloxycarbonyl-chlorid (PNZ-Cl) reagiert mit primären und sekundären Aminen zu den entsprechenden *p*-Nitrobenzylcarbamat, welche im UV-Bereich bestimmt werden können [170]. Überschüssiges PNZ-Cl muß nach der Reaktion entfernt werden, um eine Interaktion des aggressiven Chlorameisensäureesters mit der stationären Phase zu verhindern. Aus dieser Reaktion könnten sich irreversible Schäden am Säulenmaterial ergeben, die zu einer Verringerung der Lebensdauer der Trennsäule führen. Um dies zu verhindern, wurde Glycin als Scavengerreagenz eingesetzt. Glycin hat den Vorteil, daß sein PNZ-Cl-Derivat bereits in den ersten Minuten der Analyse eluiert. Somit wurde die Bestimmung der untersuchten Aminderivate nicht gestört.

3.4.1 Optimierung der chromatographischen Trennungen

3.4.1.1 Manuelle Vorsäulenderivatisierung der biogenen Amine

Die Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl der Amine wurde manuell wie folgt durchgeführt (Abb. 3-8). Dabei wurden der Probe Boratpuffer (0,5 M, pH 8,5), PNZ-Cl-Reagenz zugesetzt. Nach einer Derivatisierungszeit von 10 min erfolgte die Zugabe des Scavengers Glycin. Anschließend wurden 20 µl der verdünnten Lösung in die HPLC-Apparatur injiziert [171,173].

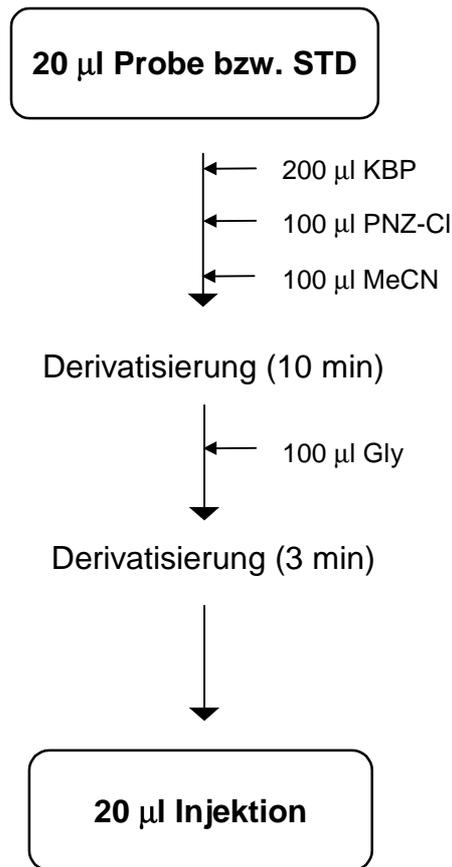


Abb. 3-8: Schema der Derivatisierung der Amine mit PNZ-Cl nach KIRSCHBAUM et al. [173]

3.4.1.2 Chromatographische Trennungen der biogenen Amine

Die Trennung der untersuchten Aminosäuren erfolgte mittels eines tertiären Gradientensystems auf einer Superspher 100 RP-18e-Säule bei einer Säulenofentemperatur von 35 °C. Das Gradientenprogramm zur Trennung der PNZ-Cl-Derivate ist in Tabelle 3-8 dargestellt. Als Eluent A und C diente dabei jeweils ein Acetatpuffer (100 mM, pH 6,1 bzw. pH 4,3). Eluent B war reines Acetonitril. Das mit diesem Gradientenprogramm erhaltene Standardchromatogramme sind in Abbildung 3-9 gezeigt.

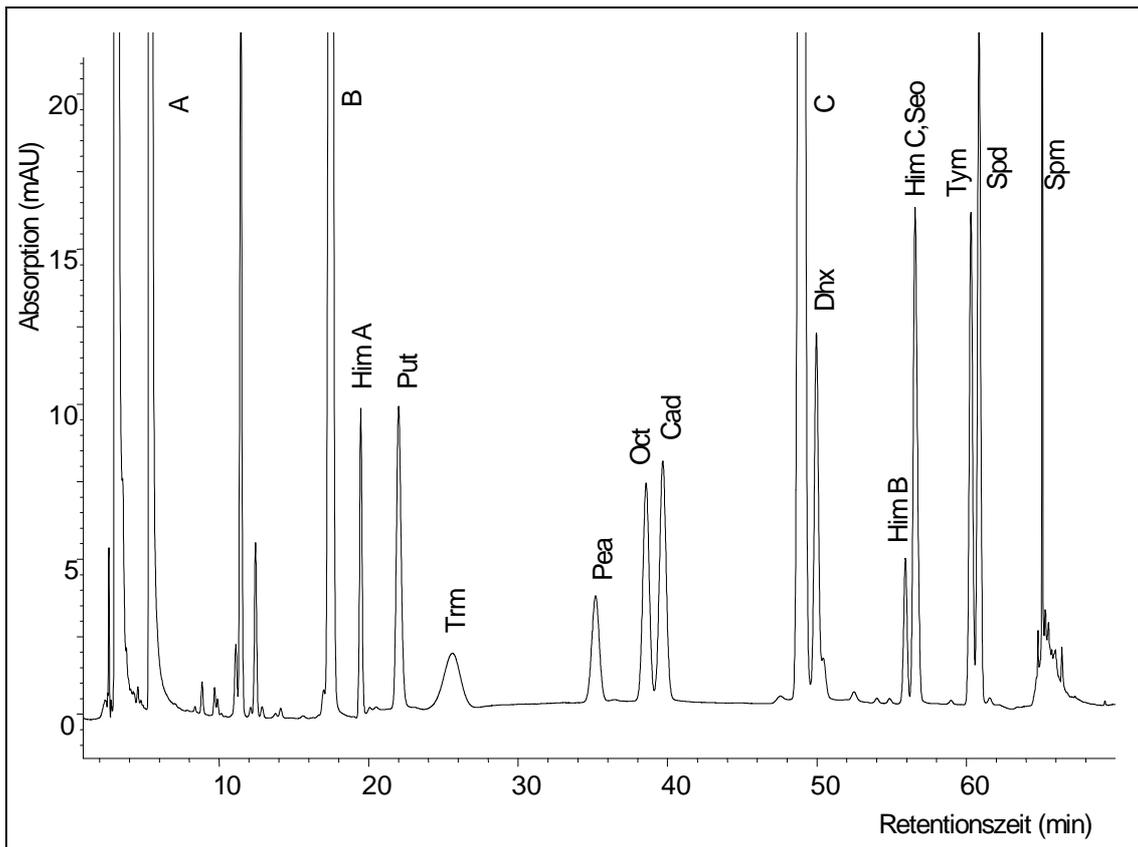


Abb. 3-9: HPLC-Chromatogramm eines Standards (100 µM) nach Derivatisierung mit PNZ-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.4.1; A: PNZ-Cl-Derivate von Gly, B: *p*-Nitrobenzylalkohol, C: Carbonat aus PNZ-Cl und B

Insgesamt 11 biogene Amine konnten einschließlich des internen Standards (Dhx) mit dieser Methode bestimmt werden. Das Chromatogramm wies für Him drei Peaks auf und für die restlichen Amine jeweils einen Peak. Him "C" coeluierte dabei zusammen mit Seo, so daß Seo nicht integriert werden konnte.

Die Elutionsfolge war Him "A", Put, Trm, Pea, Ocp, Cad, Dhx, Him "B", Him C/Seo, Tym, Spd und Spm. Bei Peak "A" handelt es sich um das PNZ-Derivate von Glycin. Da dieses Derivat bereits in den ersten Minuten der Analyse eluiert, wird die Trennung nicht gestört. Somit konnte Glycin gut als Scavenger-Reagenz eingesetzt werden.

Der als "B" bezeichnete Peak stellt ein Hydrolyse-Produkt des PNZ-Cl, *p*-Nitrobenzylalkohol, dar. Zwischen diesen beiden Peaks befinden sich noch weitere vom Reagenz herrührende Peaks. Der Reagenzpeak "C" stellt das Carbonat dar,

das aus der Reaktion von PNZ-Cl und seinem Alkohol entsteht. Bei Put, Trm, Pea und Him "B" konnte eine Basislinientrennung erreicht werden. Probleme stellten sich bei Him "A" bzw. Spm heraus. Him "A" eluiert in einem Bereich in dem auch die PNZ-Derivate der Aminosäuren, vor allem von Orn und Lys, liegen können, was somit die Bestimmung dieses Aminderivats erschwerte. Aus diesem Grund wurde in der Auswertung der Chromatogramme ausschließlich Him "B" integriert. Spm eluierte erst von der Säule, wenn der Acetonitril-Anteil im Eluentengemisch bei ca. 75 % lag. Da hierbei auch unpolare Störsubstanzen (Verunreinigungen) von der Säule gespült wurden, war die Integration des Spm in diesem Bereich erschwert. Die Amine Ocp, Cad, Dhx, Tym und Spd werden nahezu bis zur Basislinie getrennt.

Tab. 3-8: Gradientenprogramm zur Trennung der PNZ-Cl-Derivate der biogenen Amine auf einer Superspher 100 RP-18e-Säule (250 mm x 4 mm I.D. Merck). Eluent A und C: Natriumacetat (beide 100 mM, pH 6,1 bzw. pH 4,3), Eluent B: MeCN (100 %).

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Flußrate [ml/min]
0,0	57,0	43,0	0,0	0,05
0,5	57,0	43,0	0,0	0,8
15,5	57,0	43,0	0,0	0,8
16,0	0,0	43,0	57,0	0,8
18,0	0,0	43,0	57,0	0,8
19,0	0,0	32,0	68,0	0,8
34,0	0,0	42,0	58,0	0,8
43,0	0,0	42,0	58,0	0,8
44,0	0,0	47,0	53,0	0,8
62,0	0,0	55,0	45,0	0,8
63,0	0,0	100,0	0,0	1,3
68,0	0,0	100,0	0,0	1,3
69,0	57,0	43,0	0,0	1,3
75,0	57,0	43,0	0,0	1,3
75,1	57,0	43,0	0,0	0,05

3.4.1.3 Detektion der biogenen Amine

Die Detektion erfolgte mittels eines Diodenarray-Detektors (DAD) bei einer Absorptionsswellenlänge von $265 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$.

3.4.2 Quantifizierung der biogenen Amine

Zur Quantifizierung der BA-Gehalte in den Proben wurden anhand der Injektion der fünf Standardgemische von 5; 10; 50; 100 sowie 250 μM die Regressionsgeraden ($y = ax + b$) zu jeder BA über Auswertung der jeweiligen Peakflächen bestimmt. Die Gleichungen der Regressionsgeraden und die Bestimmtheitsmaße sind in Anhang aufgeführt.

3.4.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze (siehe Kap. 3.2.3) der einzelnen BA in absolut injizierter Stoffmenge [pmol] sind für die PNZ-Cl-Methode in der Tabelle 3-9 dargestellt. In der vorliegenden Methode wurde als Bestimmungsgrenze für jede BA 5 μM festgelegt.

Tab. 3-9: Nachweisgrenze (NG) der einzelnen BA für die Analyse mittels HPLC nach Derivatisierung mit PNZ-Cl

Biogene Amine	NG [pmol]	Biogene Amine	NG [pmol]
Putrescin	0,6	Histamin	1,1
Tryptamin	1,5	Tyramin	0,4
β -Phenylethylamin	1,8	Spermidin	0,9
Octopamin	0,6	Spermin	4,2
Cadaverin	1,2		

3.5 GC-Methode

3.5.1 Eigenschaften der Trennphase und Derivatisierung für die Analyse mittels GC/MS

Die von FRANK et al. [55] entwickelte Trennphase Chirasil-Val besteht aus einem Polysiloxangrundgerüst, an das über einen Spacer optisch reines Valin-*tert.*-butylamid als chiraler Selektor in der L- oder D-Konfiguration gebunden ist, so daß sich zwei verschiedene Trennsäulen mit entgegengesetzter Selektivität ergeben (Chirasil-L- bzw. D-Val). Die Chirasil-Val-Phasen ermöglichen die Trennung der meisten proteinogenen Aminosäuren und ihrer D-Enantiomeren in Form ihrer *N*(*O,S*)-Perfluoracyl-Aminosäure-alkylester, wobei die D-AS-Derivate zuerst eluieren [173-176]. Hierbei sind die AS His, Trp, Cys und Arg unter den Standard-Derivatisierungsbedingungen auf Quarz Kapillaren nicht bestimmbar. Die Aminosäuren sind nur mit besonderem Aufwand, wie speziellen Derivatisierungen und deaktivierten Glaskapillaren bestimmbar. Cystein wird teilweise oxidiert, wodurch eine reproduzierbare GC-Analyse erschwert wird. Die Aminosäuren Asn und Gln werden bei den durchgeführten Derivatisierungsbedingungen aus der Säureamidform in die jeweilige Säure überführt, so daß die gefundenen Mengen an Asp und Glu der Summe aus Asp und Asn bzw. Glu und Gln entsprechen.

3.5.1.1 Veresterung der Carboxylgruppe

Im ersten Schritt der Derivatisierung wurden die AS mit 2-Propanol verestert. Hierzu wurde die Probe (oder Standard) zunächst unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Nach Zugabe von 500 µl Veresterungsreagenz (AcCl : 2-Propanol = 1:4) und 10 µl BHT-Lösung als Antioxidationsmittel wurde die Probe für eine Stunde bei 100 °C im Heizblock im geschlossenen "Reacti-Vial" erhitzt. Das Veresterungsschema ist in Abbildung 3-10 dargestellt.

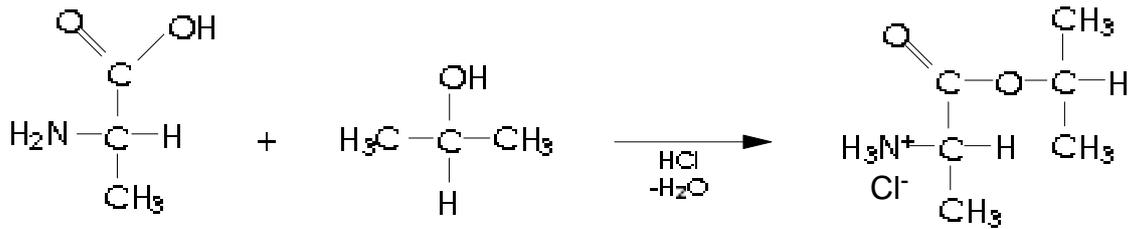


Abb. 3-10: Veresterung der Aminosäuren am Beispiel von Ala mit 2-Propanol

3.5.1.2 Acylierung der Aminogruppe

Als zweiter Schritt der Derivatisierung erfolgte eine Acylierung mit PFPAA. Hierzu wurde die Probe nach dem Abkühlen wiederum zunächst bis zur Trockene unter Stickstoffstrom eingengt. Es wurden 300 µl Dichlormethan (DCM) sowie PFPAA zugegeben und die Probe wurde bei 100 °C für 20 min im Heizblock erhitzt. Anschließend wurde die Probe abgekühlt, im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und je nach entsprechenden Verdünnungen in 100 - 200 µl DCM gelöst. Aliquote von 0,8 - 1,2 µl wurden zur Messung mittels GC/MS eingesetzt. Das Acylierungsschema ist in Abbildung 3-11 dargestellt.

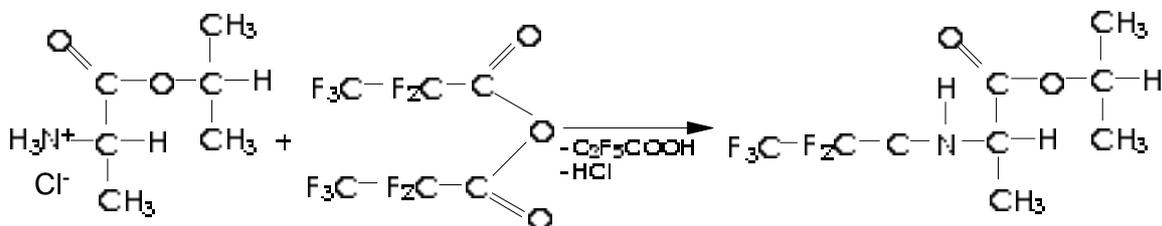


Abb. 3-11: Acylierung der Aminosäure-2-Propylester am Beispiel von Ala-2-propylester mit PFPAA

3.5.2 Trennung der Aminosäure-Derivate

Chromatographische Bedingungen

Die Chromatographischen Bedingungen für die Analyse mittels GC/MS sind in Tabelle 3-10 dargestellt. In einem Scan-Lauf unter den in Tabelle 3-10 beschriebenen Bedingungen wurden zunächst Elutionsposition und Fragmentierungsmuster der zu untersuchenden Aminosäurederivate ermittelt. Für jede Aminosäure wurden die charakteristischen Massenfragmente ausgewählt und innerhalb des Zeitintervalls, in dem die Aminosäurederivate eluieren, als sogenannte "Ionssets" festgelegt. Bei sehr dicht nacheinander eluierenden Aminosäuren wurden mehrere Fragmente innerhalb eines Zeitfensters zusammengefaßt (Abb. 3-12).

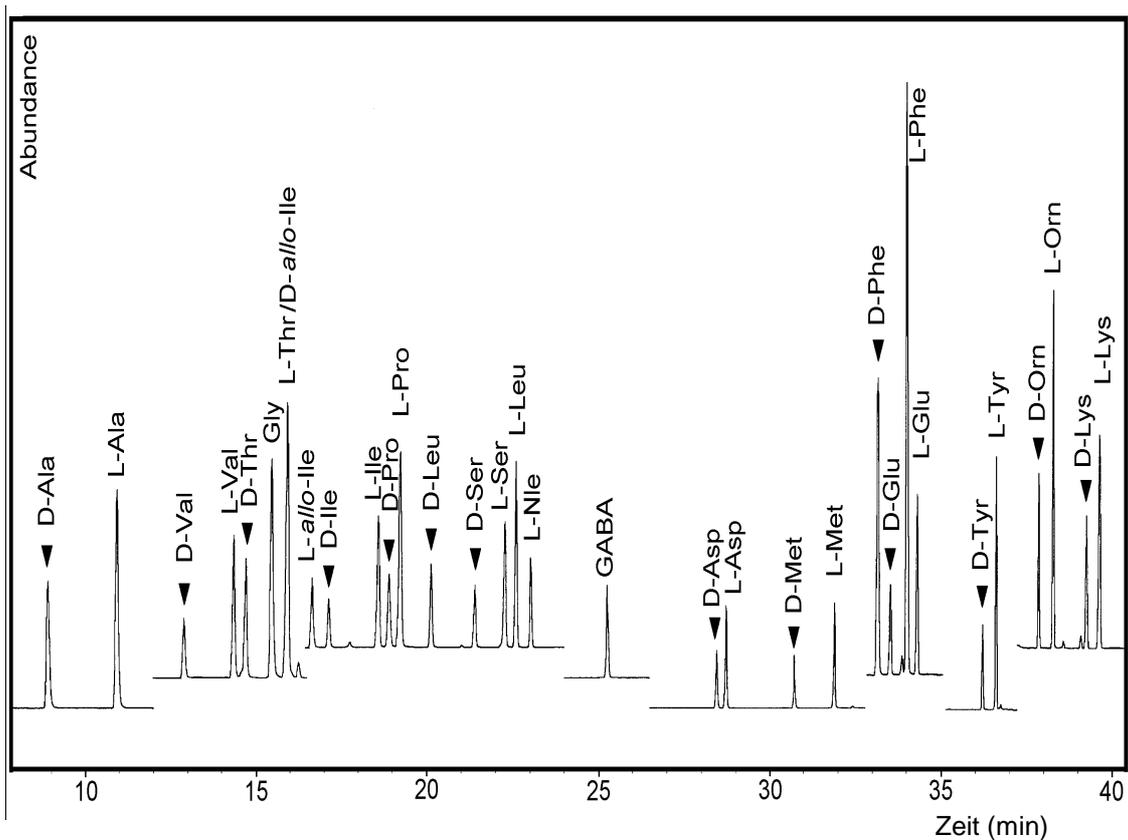


Abb. 3-12: GC-Chromatogramm eines Standards (L:D=2:1) nach Derivatisierung mit PFPAA

Ferner wurden alle Aminosäuren außer D- und L-Pro bei der Integration für die Quantifizierung nicht berücksichtigt. Die für die einzelnen Aminosäuren charakteristischen Massenfragmente sind in Tabelle 3-11 aufgeführt.

Tab. 3-10: Chromatographische Bedingungen für die Analyse mittels GC/MS

Parameter	Bedingungen
Injektortemperatur	250 ° C
Splitverhältnis	1:30
Detektortemperatur	250 ° C
Interfacetemperatur	250 ° C
Elektronenstoßenergie	70 eV
Detector Gain	1,5 kV
Temperaturprogramm	Anfang: 70 ° C (8,5 min gehalten) → 100 ° C (2,5 ° C/min) → 145 ° C (3,5 ° C/min) → 190 ° C (6,5 ° C/min)
Druckprogramm	Anfang: 5,0 kPa (8,5 min gehalten) → 7,2 kPa (0,2 kPa/min) → 11,5 kPa (0,3 kPa/min) → 15,0 kPa (0,7 kPa/min; 9,7 min gehalten)

Tab. 3-11: Zeitfenster und Massenfragmente für die Bestimmung von Aminosäureenantiomeren als *N(O)*-Pentafluorpropionyl-2-Propylester

Zeitfenster [min]	Aminosäuren	Massenfragmente [<i>m/z</i>]
6,00 - 9,20	DL-Ala	190
9,20 - 12,50	DL-Val	203, 218
12,50 - 16,70	DL-Thr	202, 203
	Gly	176, 177
	DL-Ile	203, 232
	L-allo-Ile	203, 232
16,70 - 17,40	DL-Pro	216
17,40 - 18,60	DL-Pip	230
18,60 - 20,70	DL-Leu	176, 190, 232
	DL-Ser	188, 189
20,70 - 21,20	L-Nle	176, 190, 232
21,20 - 23,40	Gaba	204, 232, 249
23,40 - 26,60	<i>trans</i> -4-L-Hyp	94, 214
	<i>cis</i> -4-D-Hyp	94, 214
26,60 - 27,70	DL-Asx	189, 234, 235, 262
27,70 - 30,10	DL-Met	203, 221, 263
31,10 - 32,50	DL-Phe	91, 148, 190, 266
	DL-Glx	202, 230, 248
32,50 - 36,80	DL-Tyr	253, 310
36,80 - 38,70	DL-Orn	216, 217, 261
38,70 - 40,10	DL-Lys	230

3.5.3 Quantifizierung der Aminosäurederivate

Zur Quantifizierung wurden zunächst die Responsefaktor, welche die Empfindlichkeit des Detektors für eine Substanz auf die einer Standardsubstanz beziehen, der einzelnen AS ermittelt [177]. Dies erfolgte mit Hilfe eines äquimolaren AS-Standards.

3.5.3.1 Ermittlung der Responsefaktoren (f_R)

In Tabelle 3-12 sind die Responsefaktoren (f_R) aller detektierbaren AS dargestellt. Die ermittelten Faktoren wurden durch dreimalige Einspritzung bestimmt. Nach Integration der Peakflächen der AS, wurden die die Responsefaktoren nach folgender Formel berechnet.

$$f_R = \frac{A_{AS}}{A_{IS}}$$

A_{AS} = Peakfläche AS [mV•s], A_{IS} = Peakfläche Nle [mV•s]

Tab. 3-12: Responsefaktoren (f_R) der Aminosäuren (n=3)

AS ¹⁾	f_R	RSD ²⁾ [%]	AS ¹⁾	f_R	RSD ²⁾ [%]
Ala	0,42	2,86	Nle	1,00	0,00
Val	0,46	3,49	Asx	1,48	6,30
Thr	0,96	9,78	Met	0,44	5,88
Gly	0,73	5,69	Phe	6,96	8,77
Ile	0,51	4,87	Glx	1,98	9,02
Pro	1,55	2,94	Tyr	1,36	11,16
Ser	1,19	5,91	Orn	0,01	14,53
Leu	1,03	3,75	Lys	2,65	11,35

¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ relative Standardabweichung

3.5.3.2 Berechnung der AS-Konzentration

Die AS-Gehalte in den untersuchten Proben wurden auch folgender Formel berechnet.

$$m_{AS} = \frac{A_{AS} \cdot n_{IS} \cdot M_{AS} \cdot f_B}{A_{IS} \cdot f_R}$$

m_{AS} = Masse AS [g], A_{AS} = Peakfläche AS [mV•s], A_{IA} = Peakfläche Interner Standard [mV•s], n_{IS} = Stoffmenge Interner Standard [mol], M_{AS} = Molmasse AS [g/mol], f_B = Verdünnungsfaktor, f_R = Responsefaktor

4 ERGEBNISSE

Es wurden 2 Rohstoffe (Sojabohnen und Sojabohnenkoji), jeweils zwei Sorten von Sojasaucen (10 Proben), Miso (8 Proben) und Pepperonipasten (8 Proben), 4 Fischsaucen und 3 Sake auf ihren Gehalt an AS, den entsprechenden D-Enantiomeren und biogene Amine untersucht. Von jeder Probe wurden mindestens zwei Aufarbeitungen je Probe vorgenommen und der Mittelwert errechnet.

4.1 Achirale Aminosäurenanalytik

Im folgenden werden alle Ergebnisse der achiralen Aminosäurenanalytik mittels HPLC nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl dargestellt. Zur besseren Orientierung wurde zunächst der Absolutgehalt an freien AS in g/kg bzw. g/l sowie der relative Anteil der jeweiligen AS bezogen auf den Gesamtgehalt an AS prozentual aufgeführt.

4.1.1 Sojabohnen und Sojabohnenkoji (Rohstoffe)

Die Ergebnisse der AS-Analyse von Sojabohnen und Sojabohnenkoji sind in Tabelle 4-1 dargestellt. Bei der Untersuchung von Sojabohnen und Sojabohnenkoji ergab sich ein breites Aminosäurespektrum. Insgesamt 20 AS (Asp, Glu, Asn, Ser, Gln, Gly, His, Thr, Arg, Ala, Gaba, Tyr, Val, Met, Ile, Trp, Phe, Leu, Lys, Pro) von 23 bestimmbaren AS wurden in Sojabohnen detektiert, wobei Asp, Glu, Arg und Tyr mit einem Anteil zwischen 11 - 17 % am Gesamtgehalt dominierend waren. Der Absolutgehalt an freien AS lag bei 1,9 g/kg Sojabohnen.

Bei Sojabohnenkoji zeigte sich eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie bei den Sojabohnen und der Gesamtgehalt an freien AS lag hier bei 2,4 g/kg. In dieser Probe waren Asp, Glu, His, Arg, Ala und Tyr die Major-AS mit einem Anteil von 7,6 - 9,5 % am Gesamt-AS-gehalt. Es wurden außerdem Cit (50 mg/kg bzw. 2,2 %) und Orn (30 mg/kg bzw. 1,2 %) detektiert, welche im Ausgangsmaterial nicht vorhanden waren. Außerdem waren die Gehalte an Arg, Tyr und Trp im Vergleich zu

den Sojabohnen erheblich gesunken. Tau war als einzige AS in keiner der Proben vorhanden. In Abbildung 4-1 sind die Chromatogramme für Sojabohnen und Sojabohnenkeji dargestellt.

Tab. 4-1: Absolutgehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der bestimmaren AS [%] in Sojabohnen und Sojabohnenkeji, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2).

Rohstoffe				
AS ¹⁾	Sojabohnen		Sojabohnenkeji	
	[g/kg]	[%] ²⁾	[g/kg]	[%] ²⁾
Asp	0,21	11,2	0,18	7,6
Glu	0,21	11,4	0,20	8,6
Asn	0,10	5,1	0,11	4,6
Ser	0,04	2,2	0,05	2,0
Gln	0,01	0,7	0,03	1,1
His	0,03	1,6	0,07	3,0
Gly	0,06	3,1	0,06	2,4
Thr	0,02	1,0	0,05	2,2
Cit	-	-	0,05	2,2
Arg	0,31	16,6	0,19	7,9
Ala	0,13	7,2	0,18	7,6
Tau	-	-	-	-
Gaba	0,03	1,8	0,07	3,0
Tyr	0,26	14,0	0,22	9,5
Val	0,05	2,5	0,12	5,2
Met	0,01	0,7	0,01	0,4
Ile	0,04	2,1	0,10	4,3
Trp	0,17	9,3	0,09	3,9
Phe	0,05	2,6	0,15	6,5
Leu	0,03	1,6	0,13	5,4
Orn	-	-	0,03	1,2
Lys	0,03	1,8	0,10	4,4
Pro	0,03	1,7	0,07	3,1
Σ AS ³⁾	1,86	100,0	2,36	100,0

¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ prozentualer Anteil bezogen auf den Gesamtgehalt; ³⁾ Gesamtgehalt [g/kg]; - nicht detektierbar

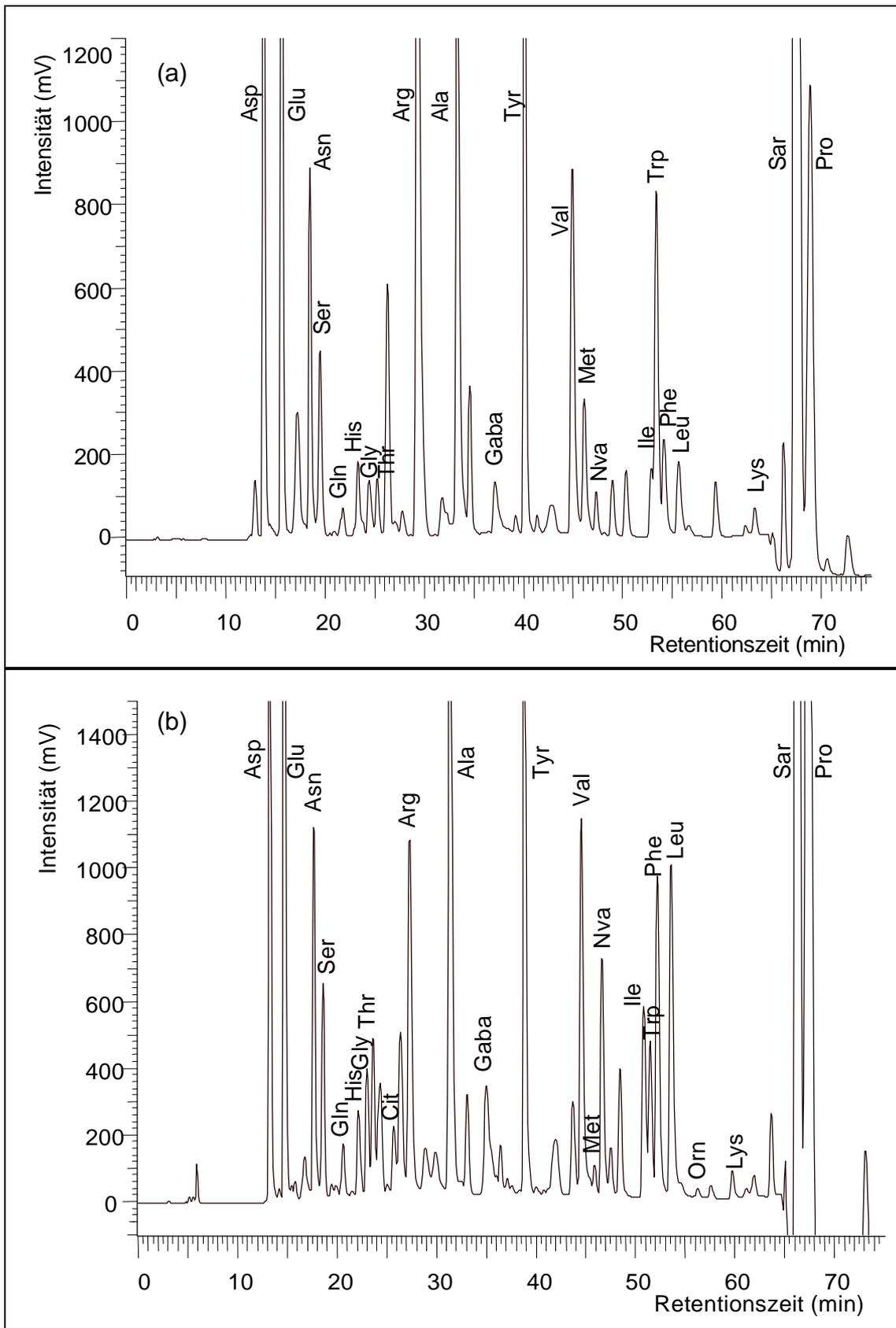


Abb. 4-1: HPLC-Chromatogramme von (a) Sojabohnen und (b) Sojabohnenkoji nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe Kap.3.2.1

4.1.2 Sojasaucen

4.1.2.1 Fermentierte Sojasaucen

Die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse der fermentierten Sojasaucen sind als Absolutgehalt an freien AS in g/l Sojasaucen sowie in g/kg bezogen auf die Trockenmasse in Tabelle 4-2 dargestellt.

15 AS (Asp, Glu, Ser, His, Thr, Arg, Ala, Tyr, Val, Ile, Phe, Leu, Orn, Lys, Pro) konnten in allen fermentierten Sojasaucenproben detektiert werden, wobei Asp, Glu, Ser, His, Ala, Val, Phe, Leu, Lys und Pro in hohen Mengen in allen Proben vorhanden waren. Die Absolutgehalte an freien AS lagen zwischen 15 g/l und 57 g/l bzw. zwischen 42 g/kg und 178 g/kg bezogen auf die Trockenmasse.

Besonders auffällig war der meist sehr hohe Gehalt an Glu in allen Proben. Der Absolutgehalt lag zwischen 2,3 g/l und 9 g/l sowie der relative Anteil zwischen 11,7 % und 24,5 % am Gesamtgehalt. Der relative Anteil am Gesamtgehalt von Asn und Arg war bei allen Proben im Vergleich zu den Rohmaterialien Sojabohnen und Sojabohnenkaji stark herabgesetzt. Gleichzeitig wurden Cit (1,2 - 3,2 %) und Orn (0,7 - 5,8 %), welche in Sojabohnen nicht vorhanden waren, in hohem Anteil gefunden. Eine Ausnahme machte die Probe A4, welche einen niedrigen relativen Anteil von Arg (0,7 %) am Gesamtgehalt, jedoch einen hohen Anteil von Orn (5,8 %) und kein Cit aufwies.

Besonders bei Orn zeigte sich eine steigende Tendenz in relativem Anteil am Gesamtgehalt der AS nach der Fermentationsdauer. Trp wurde als einzige AS in allen Proben nicht detektiert. Abbildung 4-2 zeigt ein Chromatogramm einer fermentierten Sojasaucenprobe.

Tab. 4-2: Absoluter [g/l] Gehalt an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in fermentierten Sojasaucen A1-A5, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2).

Fermentierte Sojasaucen										
AS ¹⁾	A1		A2		A3		A4		A5	
	[g/l]	[%] ²⁾	[g/l]	[%]	[g/l]	[%]	[g/l]	[%]	[g/l]	[%]
Asp	5,83	10,3	0,32	2,1	1,94	11,0	1,22	2,7	1,49	6,1
Glu	6,66	11,7	2,34	15,7	4,32	24,5	8,88	19,4	4,32	17,7
Asn	0,15	0,3	0,08	0,5	0,11	0,6	-	-	0,13	0,6
Ser	3,65	6,4	0,85	5,7	0,11	0,6	3,20	7,0	1,52	6,2
Gln	0,03	0,1	-	-	0,05	0,3	0,08	0,2	0,03	0,1
His	1,87	3,3	0,36	2,4	0,25	1,4	1,38	3,0	0,75	3,1
Gly	2,82	5,0	0,13	0,9	-	-	0,92	2,0	0,36	1,5
Thr	2,72	4,8	0,58	3,9	0,42	2,4	1,89	4,1	0,65	2,7
Cit	1,14	2,0	0,18	1,2	0,23	1,3	-	-	0,85	3,5
Arg	1,99	3,5	0,69	4,7	0,21	1,2	0,34	0,7	0,12	0,5
Ala	3,27	5,8	0,81	5,4	2,78	15,7	3,53	7,7	1,55	6,3
Tau	-	-	0,15	1,0	-	-	-	-	0,07	0,3
Gaba	-	-	0,30	2,0	0,08	0,5	-	-	0,04	0,2
Tyr	0,81	1,4	0,96	6,5	0,23	1,3	1,77	3,9	1,15	4,7
Val	3,54	6,3	1,01	6,8	2,20	12,5	3,06	6,7	1,35	5,5
Met	1,11	2,0	-	-	-	-	0,48	1,0	0,16	0,6
Ile	2,90	5,1	0,86	5,8	1,41	8,0	2,68	5,8	1,18	4,8
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	2,15	3,8	1,22	8,2	0,12	0,7	2,54	5,5	1,31	5,4
Leu	4,51	7,9	1,57	10,5	0,38	2,1	3,94	8,6	2,08	8,5
Orn	0,40	0,7	0,35	2,4	0,81	4,6	2,65	5,8	1,41	5,8
Lys	7,94	14,0	0,97	6,5	0,50	2,8	3,46	7,5	2,25	9,2
Pro	1,69	3,0	0,52	3,5	1,08	6,1	1,99	4,3	0,56	2,3
Σ AS ³⁾	56,71	100,0	14,89	100,0	17,64	100,0	45,88	100,0	24,45	100,0
Σ TM ⁴⁾	141,6		42,2		49,9		178,2		64,3	

A1-A5 Angaben siehe Kap. 2.4.2; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ prozentualer Anteil bezogen auf den Gesamtgehalt; ³⁾ Gesamtgehalt [g/l]; ⁴⁾ Gesamtgehalt [g/kg] bezogen auf Trockenmasse; - nicht detektierbar

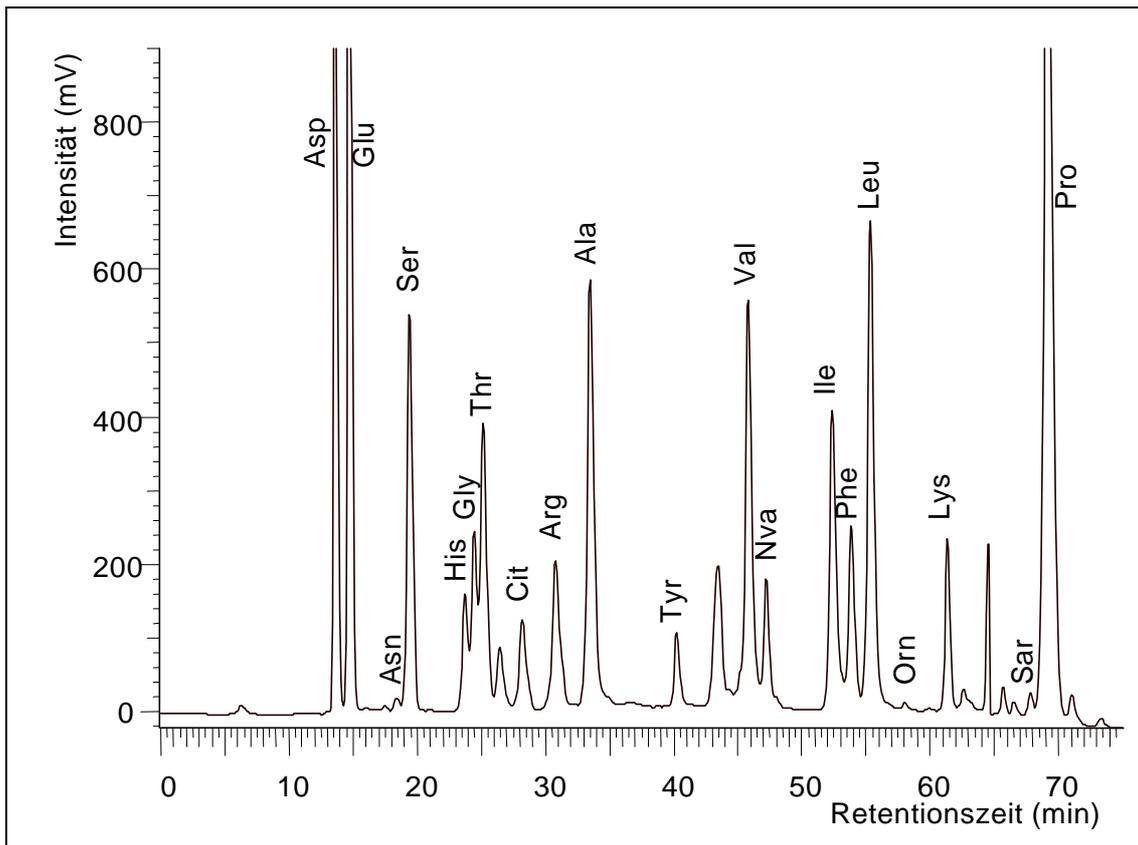


Abb. 4-2: HPLC-Chromatogramm einer fermentierten Sojasauceprobe (A1) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.2.1

4.1.2.2 Gemischte Sojasaucen

Die Ergebnisse der AS-Analyse der gemischten Sojasaucen sind mit Absolutgehalt an freien AS in g/l Sojasaucen sowie in g/kg bezogen auf die Trockenmasse in Tabelle 4-3 dargestellt. In Abbildung 4-3 ist Chromatogramme zu einer gemischten Sojasauce zu sehen.

14 AS (Asp, Glu, Ser, His, Thr, Arg, Ala, Tyr, Val, Ile, Phe, Leu, Orn, Lys) konnten in allen gemischten Sojasaucenproben detektiert werden. Im Vergleich zu den fermentierten Sojasaucen wiesen alle gemischten Sojasaucen einen hohen Absolutgehalt an freien AS auf (75 - 396 g/l bzw. 172 - 444 g/kg bezogen auf die Trockenmasse).

Tab. 4-3: Absoluter Gehalt [g/l] an Aminosäuren und relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in gemischten Sojasaucen B1-B4, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2).

Gemischte Sojasaucen								
AS ¹⁾	B1		B2		B3		B4	
	[g/l]	[%] ²⁾	[g/l]	[%]	[g/l]	[%]	[g/l]	[%]
Asp	12,01	3,0	8,43	8,8	5,39	6,7	3,51	4,7
Glu	39,64	10,0	18,36	19,2	16,64	20,8	11,92	15,9
Asn	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	10,14	2,6	6,65	7,0	5,74	7,2	3,35	4,5
Gln	-	-	-	-	-	-	-	-
His	24,1	6,1	5,64	5,9	3,23	4,0	2,69	3,6
Gly	20,51	5,2	-	-	-	-	2,18	2,9
Thr	6,58	1,7	3,91	4,1	3,12	3,9	2,18	2,9
Cit	-	-	-	-	0,10	0,1	1,38	1,8
Arg	38,48	9,7	4,85	5,1	2,99	3,7	2,41	3,2
Ala	16,69	4,2	5,95	6,2	4,75	5,9	6,46	8,6
Tau	-	-	-	-	-	-	0,22	0,3
Gaba	-	-	0,28	0,3	1,24	1,6	0,21	0,3
Tyr	14,65	3,7	1,54	1,6	2,18	2,7	1,63	2,2
Val	16,35	4,1	4,66	4,9	4,15	5,2	4,76	6,3
Met	5,52	1,4	-	-	0,97	1,2	0,35	0,5
Ile	24,85	6,3	3,27	3,4	3,06	3,8	4,21	5,6
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	23,97	6,1	3,74	3,9	3,86	4,8	3,73	5,0
Leu	36,26	9,2	7,05	7,4	6,75	8,4	6,31	8,4
Orn	0,89	-	0,15	0,2	0,65	0,8	2,09	2,8
Lys	61,24	15,5	6,27	6,6	4,23	5,3	9,95	13,3
Pro	-	3,6	4,84	5,1	5,27	6,6	2,21	2,9
Σ AS ³⁾	395,73	100,0	95,63	100,0	80,06	100,0	75,13	100,0
Σ TM ⁴⁾	444,1		321,1		247,8		172,2	

B1-B4 Angaben siehe Kap. 2.4.2;¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ prozentualer Anteil bezogen auf den Gesamtgehalt; ³⁾ Gesamtgehalt [g/l]; ⁴⁾ Gesamtgehalt bezogen auf Trockenmasse [g/kg]; - nicht detektierbar

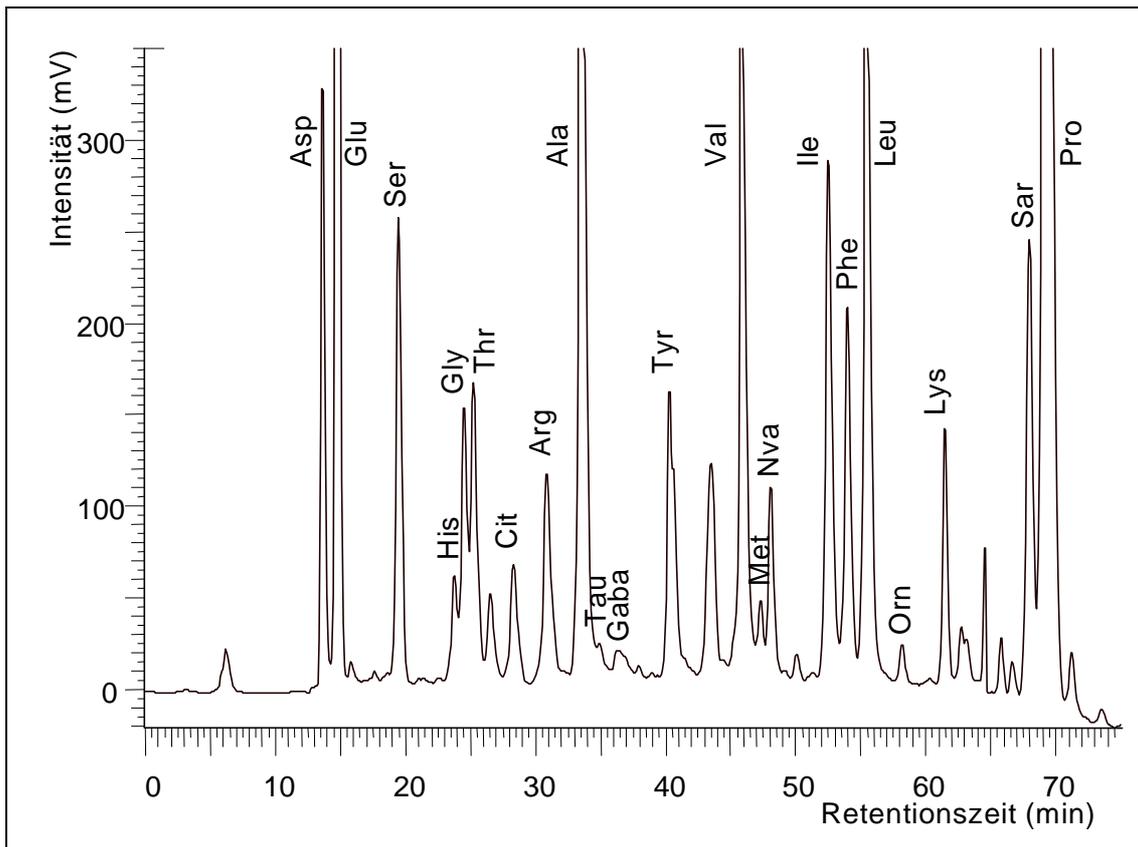


Abb. 4-3: HPLC-Chromatogramm einer gemischten Sojasauceprobe (B4) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.2.1

In allen Proben wurde ein hoher Gehalt an Glu festgestellt. Der Absolutgehalt lag dabei zwischen 12 g/l und 40 g/l, der relative Anteil zwischen 10,0 % und 20,8 % des Gesamt-AS-gehalts. Asn und Gln konnten in keiner der Proben detektiert werden. Cit wurde nur in Probe B3 (0,1 %) und B4 (1,8 %) in geringem Anteil gefunden. Orn (0,2 - 2,8 %) war in geringen Mengen bei allen Proben außer B1 nachweisbar.

4.1.3 Miso

Es wurden zwei verschiedene Misosorten untersucht, welche sich in den verwendeten Rohstoffen und der Fermentationsdauer unterschieden (siehe Kap. 2.4.3). Für die Misoproben der Serie A (Sojabohnenmiso) wurden ausschließlich Sojabohnen und Sojabohnenkoji verwendet. Diese Misoproben waren 4 bis 8 Monate fermentiert. Für Misoproben der Serie B (Weizenmiso) wurden Sojabohnenkoji und Weizen mit unterschiedlichem Anteil verwendet. Diese Miso waren 1 bis 3 Monate fermentiert.

Die Ergebnisse der AS-Analyse der Misoproben sind in Tabelle 4-4 und 4-5 dargestellt. Es wird der Absolutgehalt an freien AS g/kg Miso sowie der relative Anteil der jeweiligen AS bezogen auf den Gesamtgehalt an AS prozentual aufgeführt. Ausgewählte Chromatogramme zu den Proben sind in Abbildung 4-4 dargestellt.

Insgesamt 16 AS (Asp, Glu, Asn, Ser, Gln, Arg, Ala, Gaba, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Orn, Lys, Pro) konnten bei allen Misoproben detektiert werden. Die absoluten Gehalte der Sojabohnenmiso der Serie A lagen zwischen 21 g/kg und 71 g/kg, die der Weizenmiso der Serie B zwischen 49 g/kg und 79g/kg. Allgemein wiesen in allen untersuchten Proben Glu (14,2 - 20,6 %), Ala (5,5 - 11,7 %), Val (4,7 - 7,6 %), Leu (8,5 - 11,8 %) und Lys (7,4 - 9,7 %) sowohl in den absoluten Gehalten als auch in den relativen Anteilen die höchsten Werte auf. Bemerkenswert war auch der hohe Gehalt an Glu bei allen Proben (vgl. Untersuchung der Sojasaucen, Kap. 4.1.1 und 4.1.2). Der absolute Gehalt lag zwischen 4,39 g/kg und 14,04 g/kg, der relative Anteil zwischen 14,2 % und 20,6 %.

Die Sojabohnenmiso der Serie A wies einen höheren Anteil von Ala (9,6 - 11,7 % bzw. 5,5 - 7,2 %) und Orn (1,8 - 8,8 % bzw. 0,7 - 3,8 %) gegenüber der Serie B auf, aber einen niedrigen Anteil von Asp (0,4 - 4,6 % bzw. 5,0 - 7,5 %). Trp (4,0 - 8,0 %) wurde nur in den Probe A1 - A3 gefunden, wobei es in Serie B nicht detektiert werden konnte. Der relative Anteil von Orn zeigte auch bei dieser Analyse eine steigende Tendenz nach der Fermentationsdauer.

Tab. 4-4: Absoluter Gehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in Misoproben A1-A4, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2).

Sojabohnenmiso								
AS ¹⁾	A1		A2		A3		A4	
	[g/kg]	[%] ²⁾	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]
Asp	3,27	4,6	0,19	0,4	0,25	1,2	0,28	1,0
Glu	11,51	16,2	9,84	19,8	4,39	20,6	4,66	15,9
Asn	0,83	1,2	0,44	0,9	0,41	1,9	0,15	0,5
Ser	5,22	7,4	3,53	7,1	0,77	3,6	1,59	5,4
Gln	0,21	0,3	0,60	1,2	0,44	2,1	0,11	0,4
His	1,90	2,7	0,54	1,1	-	-	0,78	2,7
Gly	2,15	3,0	0,86	1,7	-	-	0,98	3,3
Thr	2,80	3,9	0,99	2,0	-	-	0,86	2,9
Cit	1,29	1,8	-	-	-	-	0,43	1,5
Arg	2,66	3,8	0,92	1,9	0,96	4,5	0,53	1,8
Ala	7,40	10,4	5,79	11,7	2,14	10,1	2,82	9,6
Tau	-	-	-	-	-	-	0,14	0,5
Gaba	0,29	0,4	0,03	0,1	0,11	0,5	0,14	0,5
Tyr	0,88	1,2	2,53	5,1	1,19	5,6	1,43	4,9
Val	5,38	7,6	3,52	7,1	1,50	7,0	1,51	5,1
Met	1,12	1,6	0,83	1,7	0,29	1,3	0,40	1,4
Ile	0,35	0,5	1,69	3,4	0,71	3,3	1,42	4,8
Trp	3,58	5,0	1,96	4,0	1,70	8,0	-	-
Phe	-	-	1,42	2,9	-	-	1,75	6,0
Leu	7,20	10,1	4,92	9,9	2,50	11,8	2,48	8,5
Orn	1,28	1,8	2,95	6,0	1,34	6,3	2,59	8,8
Lys	5,95	8,4	3,75	7,6	1,62	7,6	2,46	8,4
Pro	3,68	5,2	1,86	3,7	0,97	4,5	1,05	3,6
Σ AS ³⁾	70,95	100,0	49,58	100,0	21,29	100,0	29,31	100,0

A1-A4 Angaben siehe Kap. 2.4.3;¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ prozentualer Anteil bezogen auf den Gesamtgehalt [%]; ³⁾ Gesamtgehalt [g/kg]; - nicht detektierbar

Tab. 4-5: Absoluter Gehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in Misoproben B1-B4, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2).

Weizenmiso								
AS ¹⁾	B1		B2		B3		B4	
	[g/kg]	[%] ²⁾	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]
Asp	5,92	7,5	3,29	6,1	2,44	5,0	4,62	6,6
Glu	14,04	17,8	7,79	14,4	9,43	19,3	9,98	14,2
Asn	0,27	0,3	0,60	1,1	0,33	0,7	0,14	0,2
Ser	5,69	7,2	3,84	7,1	2,68	5,5	4,63	6,6
Gln	0,81	1,0	0,46	0,8	1,58	3,2	0,48	0,7
His	2,29	2,9	1,25	2,3	1,09	2,2	2,28	3,2
Gly	1,62	2,1	0,64	1,2	-	-	1,17	1,7
Thr	2,65	3,4	1,72	3,2	1,36	2,8	2,74	3,9
Cit	0,70	0,9	0,26	0,5	0,34	0,7	2,15	3,1
Arg	2,70	3,4	2,73	5,0	2,36	4,8	0,37	0,5
Ala	4,48	5,7	3,76	6,9	2,70	5,5	5,10	7,2
Tau	-	-	-	-	0,04	0,1	0,18	0,3
Gaba	0,79	1,0	1,07	2,0	0,69	1,4	1,64	2,3
Tyr	2,90	3,7	2,38	4,4	1,52	3,1	1,77	2,5
Val	4,49	5,7	2,75	5,1	2,29	4,7	3,84	5,5
Met	1,25	1,6	0,88	1,6	0,88	1,8	1,10	1,6
Ile	3,68	4,7	2,51	4,6	1,77	3,6	3,55	5,0
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	2,23	2,8	2,64	4,9	2,42	5,0	3,45	4,9
Leu	7,02	8,9	5,24	9,7	4,33	8,9	6,23	8,9
Orn	0,53	0,7	0,51	0,9	0,75	1,5	2,68	3,8
Lys	5,80	7,4	5,28	9,7	4,63	9,5	6,77	9,6
Pro	5,82	7,4	2,76	5,1	3,17	6,5	2,14	3,0
Σ AS ³⁾	78,68	100,0	54,16	100,0	48,76	100,0	70,33	100,0

B1-B4 Angaben siehe Kap. 2.4.3 ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ prozentualer Anteil bezogen auf den Gesamtgehalt [%]; ³⁾ Gesamtgehalt [g/kg]; alle Proben 2-3 Mon. fermentiert; - nicht detektierbar

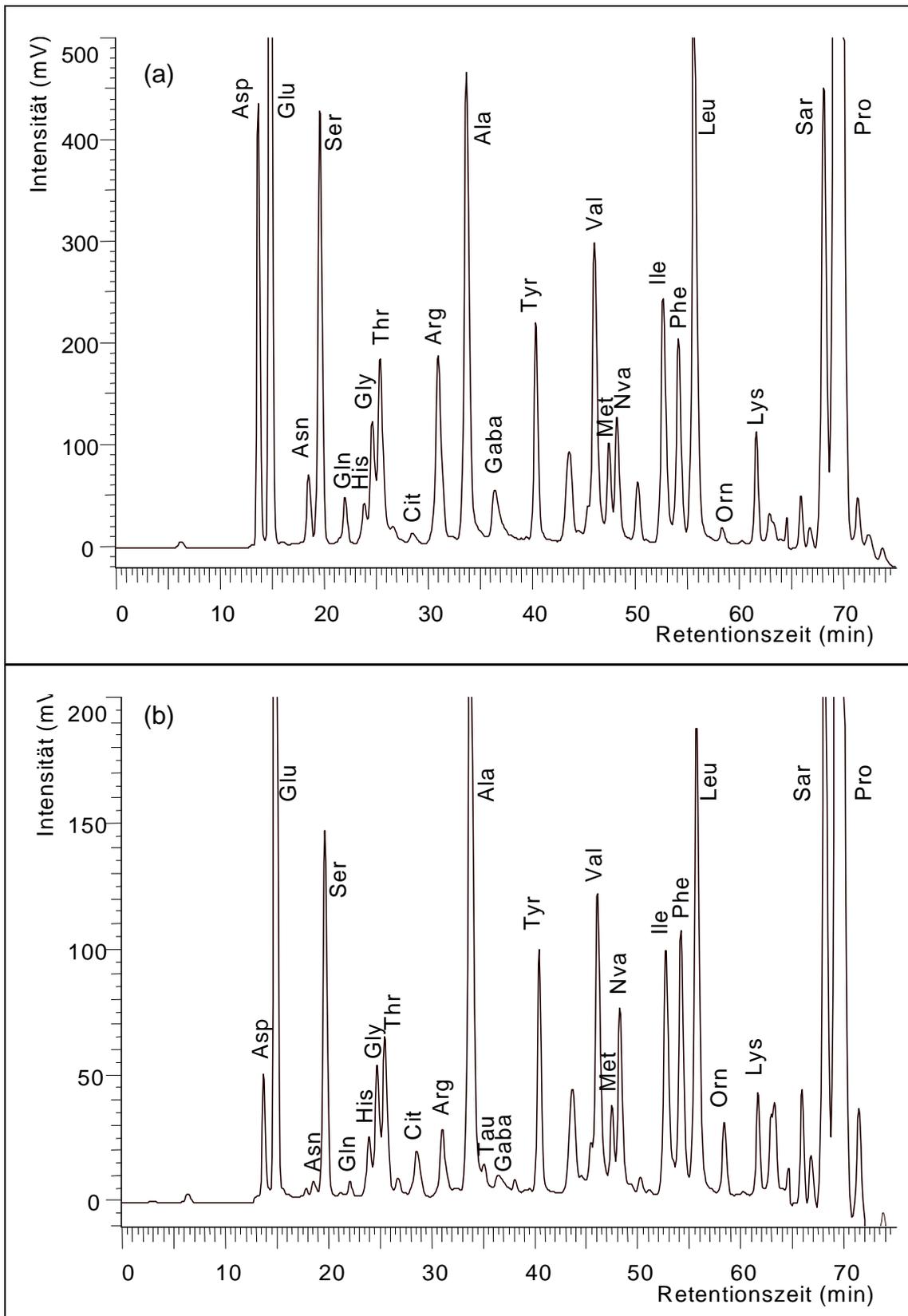


Abb. 4-4: HPLC-Chromatogramme von (a) einer Sojabohnenmiso A4 und (b) einer Weizenmiso B2 nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.2.1

4.1.4 Pepperonipasten

Es wurden zwei Gruppen von Pepperonipasten untersucht, welche sich in den verwendeten Rohstoffen und der Fermentationsdauer unterschieden (siehe Kap. 2.4.4). Für die Pepperonipasten der Serie A (Reispepperonipasten) wurden Sojabohnenkoji und Reis verwendet. Diese Pepperonipasten waren 6 bis 8 Monate fermentiert. Bei den Proben der Serie B (Weizenpepperonipasten) wurden Sojabohnenkoji bzw. Weizenkoji und Weizen mit unterschiedlichen Anteilen eingesetzt. Diese Pepperonipasten waren 2 bis 3 Monate fermentiert.

Im folgenden sind die Absolutgehalte an AS für alle Proben tabellarisch zusammengefaßt (Tab. 4-6 und 4-7). Anschließend sind Chromatogramme von ausgewählten Proben in Abbildung 4-5 abgebildet. Die Ergebnisse zeigen, daß in beiden Probengruppen eine ähnliche qualitative und quantitative AS-Verteilung vorkommt. Der Gesamtgehalt an AS lag zwischen 15 g/kg und 24 g/kg in Reispepperonipasten (Serie A) sowie zwischen 14 g/kg und 33 g/kg in Weizenpepperonipasten (Serie B). In allen Pepperonipasten waren die Gehalte an Glu, Ser, His, Arg, Ala, Val, Phe, Leu, Lys und Pro hoch. Der relative Anteil von Glu lag zwischen 6,4 % und 15,0 % in Serie A sowie zwischen 9,7 % und 25,4 % in Serie B. Damit war Glu in allen untersuchten Proben die mengenmäßig dominierende AS. Der Anteil von Asp in Serie A (3,7 - 13,1 %) war im Gegenteil zu Serie B (0,3 - 8,1 %) etwas höher. Es fällt auf, daß der Gehalt an Ala in Serie A einheitlich zwischen 6,2 - 6,8 % lag. Trp konnte in den meisten Proben nicht gefunden werden. Cit (0,5 - 1,7 %) und Orn (1,0- 1,7 %) konnten bei allen Proben der Serie A außer in Probe A3 detektiert werden. Arg (4,2 - 8,4 %) war in beiden Probengruppen in hohen Mengen vorhanden.

Tab. 4-6: Absolutgehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt [%] in Peperonipasten A1-A4, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2).

Reispeperonipasten								
AS ¹⁾	A1		A2		A3		A4	
	[g/kg]	[%] ²⁾	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]
Asp	0,84	5,7	2,01	11,8	0,89	3,7	2,52	13,1
Glu	0,93	6,4	1,83	10,8	3,01	12,7	2,89	15,0
Asn	1,79	12,2	0,21	1,3	1,84	7,7	0,60	3,1
Ser	0,99	6,8	1,22	7,2	1,41	5,9	1,18	6,1
Gln	0,08	0,5	0,08	0,5	0,07	0,3	0,05	0,2
His	0,27	1,9	0,30	1,8				
Gly	0,39	2,7	0,47	2,8	1,20	5,1	0,92	4,8
Thr	0,56	3,8	0,71	4,2	0,75	3,1	0,65	3,4
Cit	0,24	1,7	0,28	1,7	-	-	0,10	0,5
Arg	0,82	5,6	0,97	5,7	1,35	5,7	1,02	5,3
Ala	0,93	6,4	1,08	6,4	1,61	6,8	1,20	6,2
Tau	0,10	0,7	-	-	-	-	-	-
Gaba	0,54	3,7	0,66	3,9	1,02	4,3	0,63	3,3
Tyr	0,57	3,9	0,72	4,3	1,09	4,6	0,78	4,0
Val	0,76	5,2	0,84	5,0	1,44	6,1	0,93	4,8
Met	0,11	0,7	0,11	0,7	0,09	0,4	0,04	0,2
Ile	0,53	3,6	0,61	3,6	1,02	4,3	0,62	3,2
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	0,67	4,6	0,80	4,8	1,27	5,4	0,88	4,5
Leu	0,41	2,8	0,99	5,9	1,71	7,2	1,16	6,0
Orn	0,24	1,7	0,28	1,7	-	-	0,18	1,0
Lys	0,74	5,0	0,89	5,3	0,98	4,1	0,89	4,6
Pro	1,87	12,8	1,63	9,6	2,96	12,5	2,04	10,6
Σ AS ³⁾	14,61	100,0	16,93	100,0	23,70	100,0	19,29	100,0

A1-A4 Angaben siehe Kap. 2.4.4; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ prozentualer Anteil bezogen auf den Gesamtgehalt [%]; ³⁾ Gesamtgehalt [g/kg]; - nicht detektierbar

Tab. 4-7: Absolutgehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt [%] in Pepperonipasten B1-B4, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2).

Weizenpepperonipasten								
AS ¹⁾	B1		B2		B3		B4	
	[g/kg]	[%] ²⁾	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]
Asp	1,66	8,1	0,90	2,7	0,06	0,3	0,05	0,3
Glu	2,49	12,1	8,33	25,1	4,74	25,4	1,39	9,7
Asn	0,16	0,8	1,03	3,1	0,34	1,8	1,16	8,1
Ser	1,48	7,2	1,77	5,3	0,96	5,1	0,83	5,8
Gln	0,75	3,7	3,17	9,5	0,16	0,8	0,27	1,9
His	0,14	0,7	0,11	0,3	-	-	-	-
Gly	1,23	6,0	1,41	4,3	0,73	3,9	0,70	4,9
Thr	0,60	2,9	0,73	2,2	0,54	2,9	0,58	4,0
Cit	0,21	1,0	0,25	0,7	-	-	0,06	0,4
Arg	1,26	6,1	1,66	5,0	0,78	4,2	1,20	8,4
Ala	1,16	5,6	1,12	3,4	0,93	5,0	0,80	5,6
Tau	-	-	0,09	0,3	-	-	0,06	0,4
Gaba	-	-	0,45	1,4	0,50	2,7	0,35	2,4
Tyr	0,91	4,4	0,93	2,8	0,63	3,4	0,60	4,2
Val	1,04	5,1	1,23	3,7	0,91	4,9	0,80	5,6
Met	0,23	1,1	0,28	0,8	0,07	0,4	0,15	1,1
Ile	0,90	4,4	1,02	3,1	0,59	3,1	0,52	3,6
Trp	0,57	2,8	0,09	0,3	-	-	-	-
Phe	0,59	2,9	1,56	4,7	0,88	4,7	0,72	5,0
Leu	1,72	8,3	2,19	6,6	1,19	6,4	1,09	7,6
Orn	-	-	0,19	0,6	0,10	0,5	-	-
Lys	0,92	4,4	0,96	2,9	0,35	1,9	0,66	4,6
Pro	2,55	12,4	3,73	11,2	4,20	22,5	2,33	16,2
Σ AS ³⁾	20,57	100,0	33,20	100,0	18,66	100,0	14,32	100,0

B1-B4 Angaben siehe Kap. 2.4.2; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ prozentualer Anteil bezogen auf den Gesamtgehalt [%]; ³⁾ Gesamtgehalt [g/kg]; alle Proben 2-3 Mon. fermentiert; - nicht detektierbar

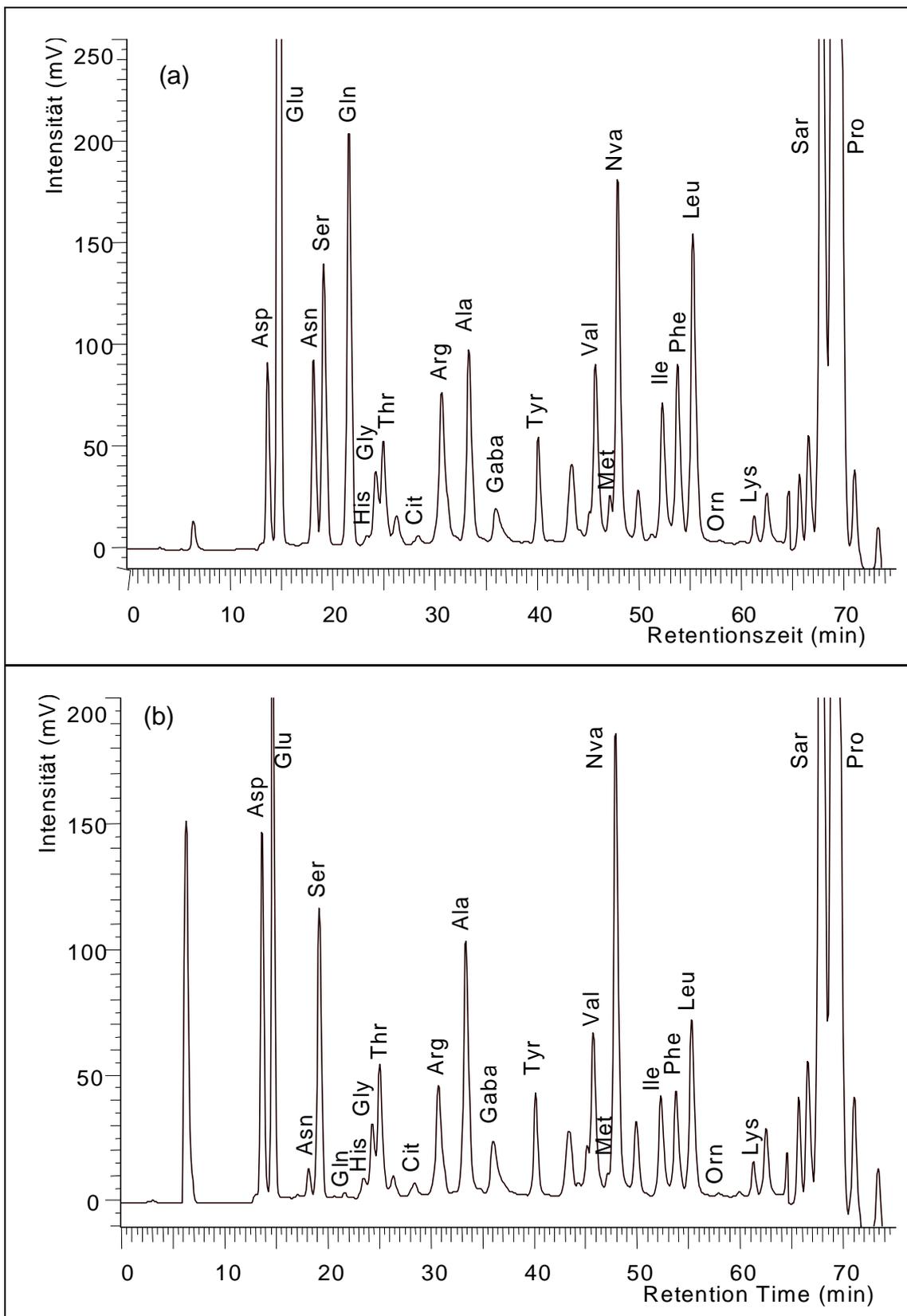


Abb. 4-5: HPLC-Chromatogramme von (a) einer Reispfefferonipasten A2 und (b) einer Weizenpfefferonipasten B2 nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.2.1

4.1.5 Sake

Die Ergebnisse der AS-Analyse der Sakeproben sind in Tabelle 4-8 dargestellt. Allgemein wiesen alle untersuchten Probe niedrige Mengen an freien AS auf, wobei die Proben A2 und A3 eine sehr ähnliche qualitative und quantitative AS-Zusammensetzung aufwiesen. Die Absolutgehalte an AS beider Proben lagen zwischen 3137 mg/l und 3140 mg/l. In beiden Proben war der relative Anteil von Arg am Gesamtgehalt mit 21,7 % bzw. 24,0 % am höchsten.

Eine Ausnahme zeigte Sake A1, welche einen Absolutgehalt von 516 mg/l und besonders hohen Anteil von Asn (61,9 %) aufwies. In dieser Probe wurde eine niedrige Menge von Orn (1,2 mg/l) im Gegensatz zu den anderen Sakeproben (116 - 148 mg/l) festgestellt. Cit war in keiner Probe nachweisbar. Ein Chromatogramm einer Sakeprobe ist in Abbildung 4-6 dargestellt.

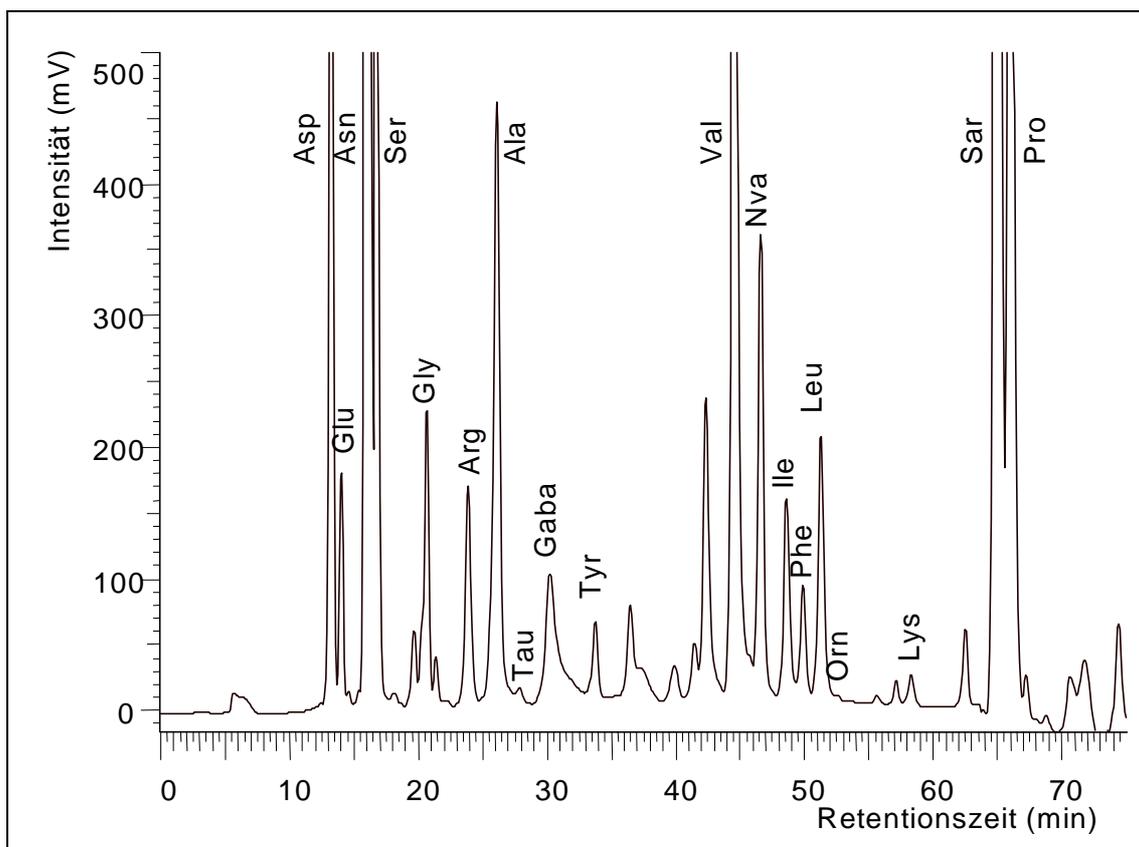


Abb. 4-6: HPLC-Chromatogramm einer Sakeprobe (A1) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.2.1

Tab. 4-8: Absoluter Gehalt [mg/l] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in Sake A1-A3, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2).

AS ¹⁾	Sake					
	A1		A2		A3	
	[mg/l]	[%] ²⁾	[mg/l]	[%]	[mg/l]	[%]
Asp	26,83	5,2	27,59	0,9	21,63	0,7
Glu	7,06	1,4	354,57	11,3	361,48	11,5
Asn	319,51	61,9	166,94	5,3	147,91	4,7
Ser	22,51	4,4	100,37	3,2	112,11	3,6
Gln	-	-	24,46	0,8	17,85	0,6
His	-	-	-	-	-	-
Gly	3,46	0,7	-	-	56,91	1,8
Thr	-	-	-	-	-	-
Cit	-	-	-	-	-	-
Arg	12,05	2,3	753,27	24,0	265,28	8,5
Ala	28,39	5,5	484,32	15,4	679,18	21,7
Tau	0,75	0,2	-	-	-	-
Gaba	26,99	5,2	-	-	-	-
Tyr	7,50	1,5	193,84	6,2	256,82	8,2
Val	14,10	2,7	154,03	4,9	226,68	7,2
Met	-	-	48,58	1,6	18,04	0,6
Ile	10,57	2,1	77,46	2,5	131,54	4,2
Trp	-	-	-	-	-	-
Phe	6,72	1,3	171,32	5,5	180,48	5,8
Leu	12,08	2,3	278,31	8,9	293,75	9,4
Orn	1,22	0,2	115,62	3,7	148,27	4,7
Lys	10,61	2,1	98,86	3,2	111,88	3,6
Pro	6,04	1,2	90,64	2,9	107,61	3,4
Σ AS ³⁾	516,40	100,0	3140,16	100,0	3137,42	100,0

A1-A3 Angaben siehe Kap. 2.4.5; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ prozentualer Anteil bezogen auf den Gesamtgehalt [%]; ³⁾ Gesamtgehalt [mg/l]; - nicht detektierbar

4.1.6 Fischsaucen Sake

Die Ergebnisse der AS-Analyse von Fischsaucen sind in Tabelle 4-9 dargestellt. Bei der Untersuchung wurden insgesamt 15 AS (Asp, Glu, Ser, His, Thr, Cit, Ala, Val, Met, Ile, Phe, Leu, Orn, Lys, Pro) von 23 bestimmbaren AS detektiert, wobei Glu (12,9 - 17,6 %), His (5,8 - 12,3 %), Ala (7,3 - 10,5 %) und Lys (12,6 - 14,4 %) einen hohen relativen Anteil am Gesamtgehalt aufwiesen. Der Absolutgehalt an freien AS lag zwischen 73 g/kg und 155 g/kg Fischsaucen. Es wurden bei allen Proben sowohl Cit (1,9 - 4,5 %) als auch Orn (1,8 - 4,4 %) in hohen Mengen detektiert, wobei Arg nur in den Fischsaucen A2 und A4 in geringen Mengen vorhanden war. Trp wurde als einzige AS in keiner Probe nachgewiesen. Abbildung 4-7 zeigt ein Chromatogramm einer Fischsauce.

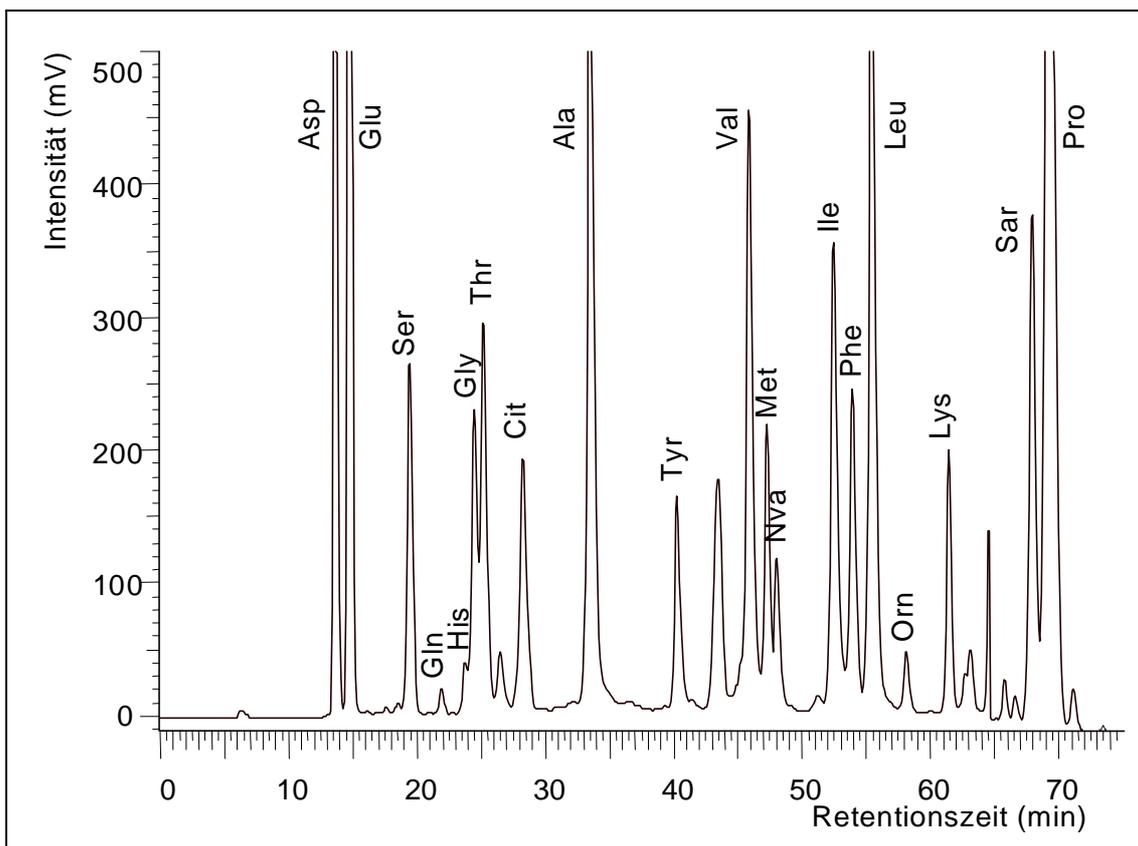


Abb. 4-7: HPLC-Chromatogramm einer Fischsaucenprobe (A1) nach Derivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.2.1

Tab. 4-9: Absoluter Gehalt [g/kg] an Aminosäuren sowie relativer Anteil der jeweiligen Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt der AS [%] in Fischsaucen A1-A4, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/MPA-FMOC-Cl (n=2).

Fischsaucen								
AS ¹⁾	A1		A2		A3		A4	
	[g/kg]	[%] ²⁾	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]
Asp	7.92	8.7	3.61	4.6	1.68	2.3	13.18	8.5
Glu	13.25	14.5	10.57	13.4	9.39	12.9	27.33	17.6
Asn	-	-	-	-	-	-	0.31	0.2
Ser	3.23	3.5	2.85	3.6	2.58	3.6	6.98	4.5
Gln	0.28	0.3	-	-	0.01	0.1	0.23	0.2
His	5.34	5.8	8.24	10.5	8.64	11.9	19.08	12.3
Gly	0.43	0.5	0.73	0.9	-	-	1.69	1.1
Thr	3.86	4.2	3.80	4.8	3.48	4.8	6.15	4.0
Cit	3.43	3.8	3.15	4.0	3.27	4.5	2.89	1.9
Arg	-	-	0.25	0.3	-	-	3.78	2.4
Ala	6.68	7.3	7.74	9.8	7.59	10.5	11.67	7.5
Tau	-	-	-	-	0.63	0.9	-	-
Gaba	-	-	-	-	-	-	0.15	0.1
Tyr	2.75	3.0	1.2	1.5	-	-	1.45	0.9
Val	5.63	6.2	5.94	7.5	5.66	7.8	9.44	6.1
Met	2.72	3.0	2.37	3.0	2.12	2.9	4.21	2.7
Ile	4.77	5.2	4.73	6.0	4.32	6.0	6.24	4.0
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	4.04	4.4	3.02	3.8	2.90	4.0	4.89	3.2
Leu	8.19	9.0	6.84	8.7	6.56	9.0	9.21	5.9
Orn	4.03	4.4	1.45	1.8	1.57	2.2	3.55	2.3
Lys	13.15	14.4	9.94	12.6	9.41	13.0	19.95	12.9
Pro	1.81	2.0	2.30	2.9	2.80	3.9	2.90	1.9
Σ AS ³⁾	91.50	100.0	78.73	100.0	72.61	100.0	155.28	100.0

A1-A4 Angaben siehe Kap. 2.4.6; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolgen; ²⁾ prozentualer Anteil bezogen auf den Gesamtgehalt [%]; ³⁾ Gesamtgehalt [g/kg]; - nicht detektierbar

4.2 Chirale Aminosäureanalytik

Im folgenden werden alle Ergebnisse der chiralen Aminosäureanalytik mittels HPLC nach Derivatisierung mit OPA/IBLC bzw. OPA/IBDC dargestellt. Alle Gehalte von D-Pro wurden mittels GC/SIM-MS nach Derivatisierung mit *N*(*O*)-Pentafluorpropionyl-2-Propylester ermittelt. Die relativen Gehalte der D-AS an den jeweiligen freien AS wurden prozentual aufgeführt.

4.2.1 Sojabohnen und Sojabohnenkoji (Rohstoffe)

Um einen besseren Vergleich von qualitativer und quantitativer Analyse von D-Aminosäuren in Sojaprodukten erhalten zu können, wurden zuerst Sojabohnen und Sojabohnenkoji untersucht, welche als wesentliche Rohstoffe zur Herstellung der fermentierten Sojaprodukte dienen. Die gefundenen relativen Gehalte an D-Aminosäuren in Sojabohnen und Sojabohnenkoji sind in Tabelle 4-10 zusammengefaßt. In Sojabohnen wurden lediglich D-Asp (0,5 %), D-Glu (0,5 %) und D-Ala (7,8 %) detektiert. Sojabohnenkoji zeigte im Vergleich dazu ein breites D-Aminosäurenspektrum. Außer D-Asp (3,4 %), D-Glu (6,4 %) und D-Ala (24,8 %) wurden in Sojabohnenkoji D-Ser (5,4 %), D-Phe (5,1 %) und D-Leu (2,1 %) gefunden. D-Ala stellte damit in den beiden Rohstoffen die Major-AS dar. Ausgewählte Chromatogramme der Proben sind in den Abbildung 4-8 und 4-9 dargestellt.

Tab. 4-10: Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in Sojabohnen und Koji, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]

D-AS ¹⁾	Sojabohnen	Koji
Asp	0,5	3,4
Glu	0,5	6,4
Ser	-	5,4
Ala	7,8	24,8
Phe	-	5,1
Leu	-	2,1
Pro ²⁾	-	2,8

1) Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ bestimmt mittels GC nach Derivatisierung mit *N*(*O*)-Pentafluorpropionyl-2-Propylester an Chirasil-L-Val; -: nicht detektierbar

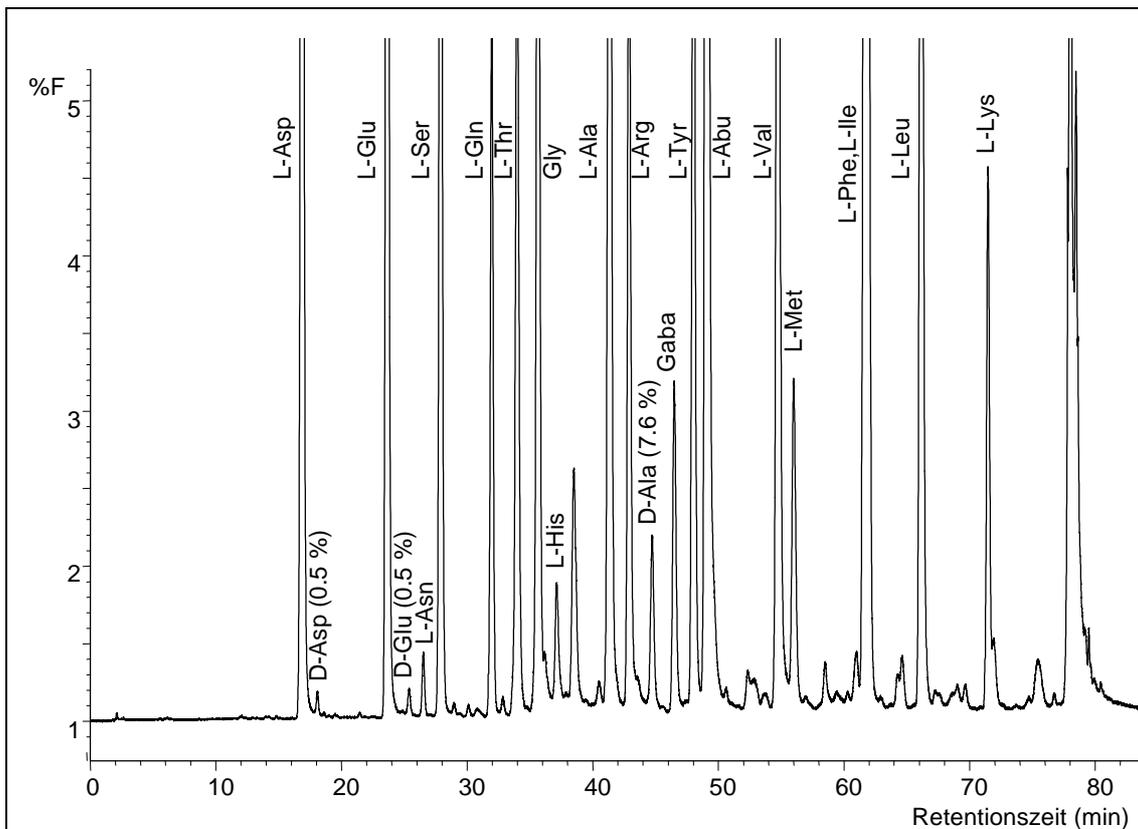


Abb. 4-8: HPLC-Chromatogramm von Sojabohnen nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System HP 1090 L. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.3.1

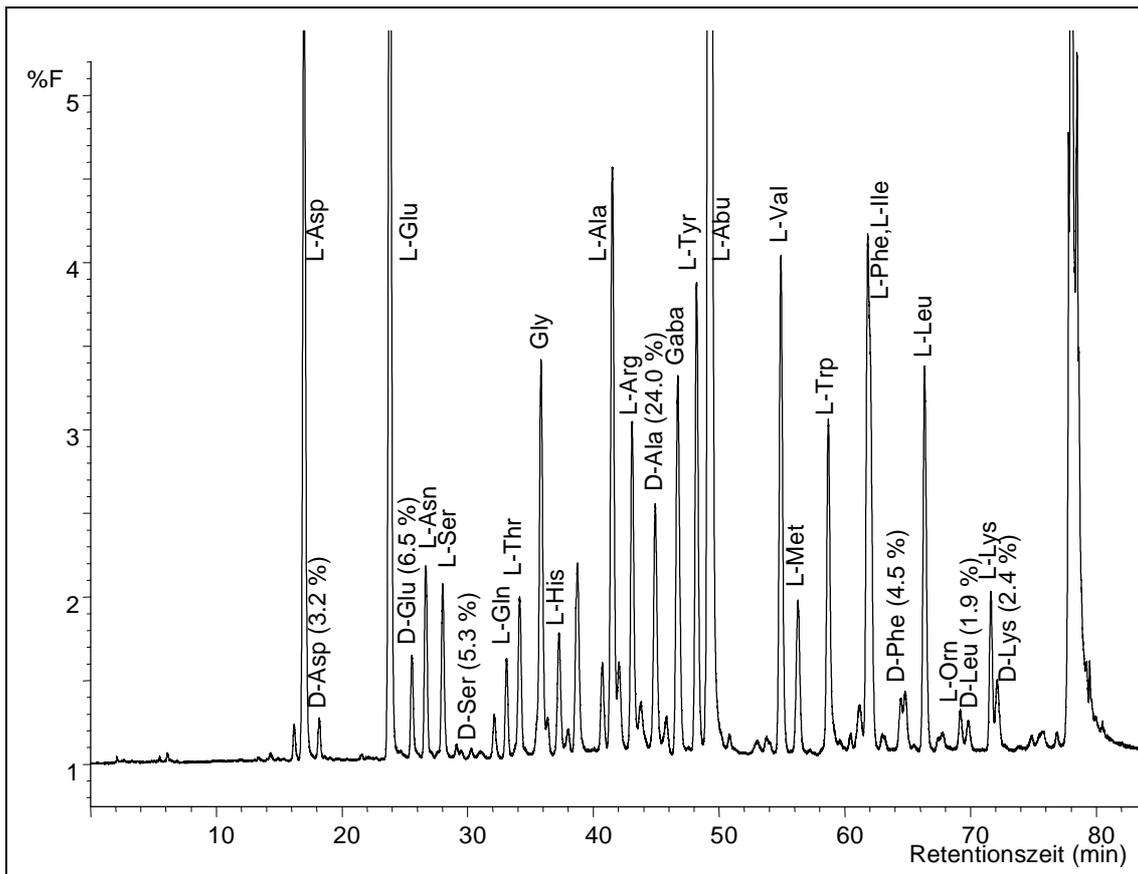


Abb. 4-9: HPLC-Chromatogramm von Sojabohnenkoji nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System HP 1090 L. Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.3.1

4.2.2 Sojasaucen

4.2.2.1 D-Aminosäuren in fermentierten Sojasaucen

Die gefundenen relativen Gehalte an D-Aminosäuren in den fermentierten Sojasaucenproben sind in Tabelle 4-11 zusammengefaßt. Ein ausgewähltes Chromatogramm einer Probe ist in Abbildung 4-10 dargestellt. Die relativen Gehalte an D-AS, welche bei allen Sojasaucenproben detektiert werden konnten, wurden als Mittelwerte aufgeführt.

Alle fermentierte Sojasaucen wiesen einen hohen Gehalt an D-Ala (16,8 - 47,7 %), D-Asp (0,6 - 30,0 %) und D-Pro (0,3 - 3,2 %) auf, wobei D-Glu außer in Probe A4 mit einem relativen Gehalt zwischen 1,5 % und 9,8 % nachgewiesen werden konnte. Diese D-AS wurden zuvor in Sojabohnen und Sojabohnenkoji als häufig vorkommenden AS festgestellt. Besonders der relative Gehalt an D-Ala war im Vergleich zu dem Gehalt an D-Asp und D-Glu bei allen Proben sehr hoch. D-Ala wurde somit in fermentierten Sojasaucen als die dominierende AS festgestellt. Das in Sojabohnenkoji detektierte D-Phe konnte bei keiner Probe gefunden werden. In der Probe A1 waren sowohl die Gehalte an D-Ala (47,4 %) als auch an D-Asp (30,0 %) sehr hoch. Die Probe A2 wies als einzige D-Ser (1,7 %) auf.

Tab. 4-11: Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in fermentierten Sojasaucen A1-A6, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/-IBL(D)C (n=2). [% D = D*100/(D+L)]

Fermentierte Sojasaucen							
D-AS ¹⁾	A1	A2	A3	A4	A5	A6	\bar{x} ³⁾
Asp	30,0	7,0	10,4	5,5	2,5	0,6	9,3
Glu	9,8	5,0	2,3	-	1,5	2,0	-
Ser	-	1,7	-	-	-	-	-
Ala	47,4	22,2	34,5	24,1	43,3	16,8	31,4
Leu	2,6	-	-	1,8	-	-	-
Lys	-	-	-	14,0	19,1	2,9	-
Pro ²⁾	3,2	2,5	2,1	2,6	3,0	0,3	5,8

A1-A6 Angaben siehe Kap. 2.4.2; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ bestimmt mittels GC nach Derivatisierung mit *N*(*O*)-Pentafluorpropionyl-2-Propylester an Chirasil-L-Val; ³⁾ Mittelwert nur für die in allen Proben vorkommenden D-AS; - nicht detektierbar

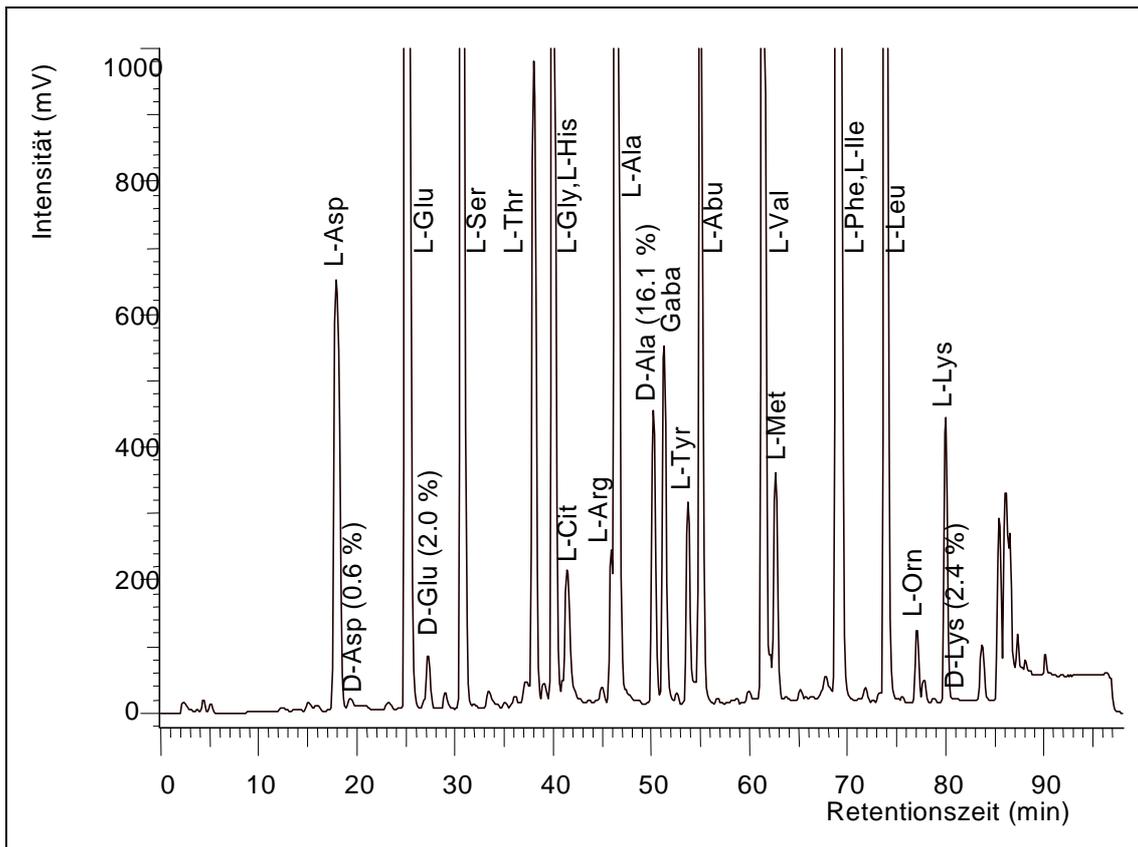


Abb. 4-10: HPLC-Chromatogramm einer fermentierten Sojasauceprobe (A6) nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom . Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.3.2

4.2.2.2 D-Aminosäuren in gemischten Sojasaucen

Die relativen Gehalte an D-Aminosäuren in den gemischten Sojasauceproben sind in Tabelle 4-12 dargestellt. Als Mittelwerte wurden nur die relativen Gehalte an D-AS aufgeführt, welche bei allen Sojasauceproben detektiert werden konnten. Im Falle der gemischten Sojasauceproben wurden außer den D-AS, welche bereits bei den fermentierten Sojasaucen gefunden werden konnten, zusätzlich in Probe B3 D-Arg (7,8 %) und D-Phe (3,4 %) detektiert. D-Asp (6,1 - 32,9 %), D-Ala (7,3 - 20,3 %) und D-Pro (3,1 - 11,3 %) war auch in dieser Sojasauceart die D-AS mit den höchsten D-AS-Gehalt. Im Gegensatz zu den fermentierten Sojasaucen war der Gehalt an

D-Asp bei allen gemischten Proben viel höher als der D-Ala-Gehalt, wobei mit steigenden Hydrolysatanteil eine höhere D-Asp-Menge gefunden wurde. D-Glu (6,1 - 16,6 %) wurde im Vergleich zu den fermentierten Sojasaucen in allen Proben in hoher Relativgehalt gefunden. D-Leu wurde nur Probe B2 gefunden. In dieser Sojasauce war D-Asp die Major-AS. Ein Chromatogramm einer ausgewählten Probe ist in der Abbildung 4-11 gezeigt.

Tab. 4-12: Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in gemischten Sojasaucen B1-B5, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/-IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]

Gemischte Sojasaucen						
D-AS ¹⁾	B1 ²⁾ [100:0] ³⁾	B2 [75:15]	B3 [80:20]	B4 [70:30]	B5 [50:50]	\bar{x} ⁴⁾
Asp	7,6	23,0	23,0	32,9	21,7	21,6
Glu	4,0	7,3	7,8	16,6	6,1	8,4
Ser	0,8	-	-	8,7	-	-
Arg	1,3	-	-	7,8	-	-
Ala	1,5	7,3	8,7	15,3	20,8	10,7
Val	1,5	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	3,4	-	-
Leu	1,7	-	5,8	-	-	-
Lys	1,6	-	10,2	6,6	7,2	-
Pro ⁵⁾		3,6	3,1	5,2	-	-

B1-B5 Angaben siehe Kap. 2.4.2; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ nach industrieller Rezeptur hydrolysiert; ³⁾ Verhältnisse zwischen hydrolysierten und fermentierten Sojasaucen (v:v); ⁴⁾ Mittelwert nur für die in allen Proben vorkommenden D-AS; ⁵⁾ bestimmt mittels GC nach Derivatisierung mit *N*(O)-Pentafluorpropionyl-2-Propylester an Chirasil-L-Val; - nicht detektierbar

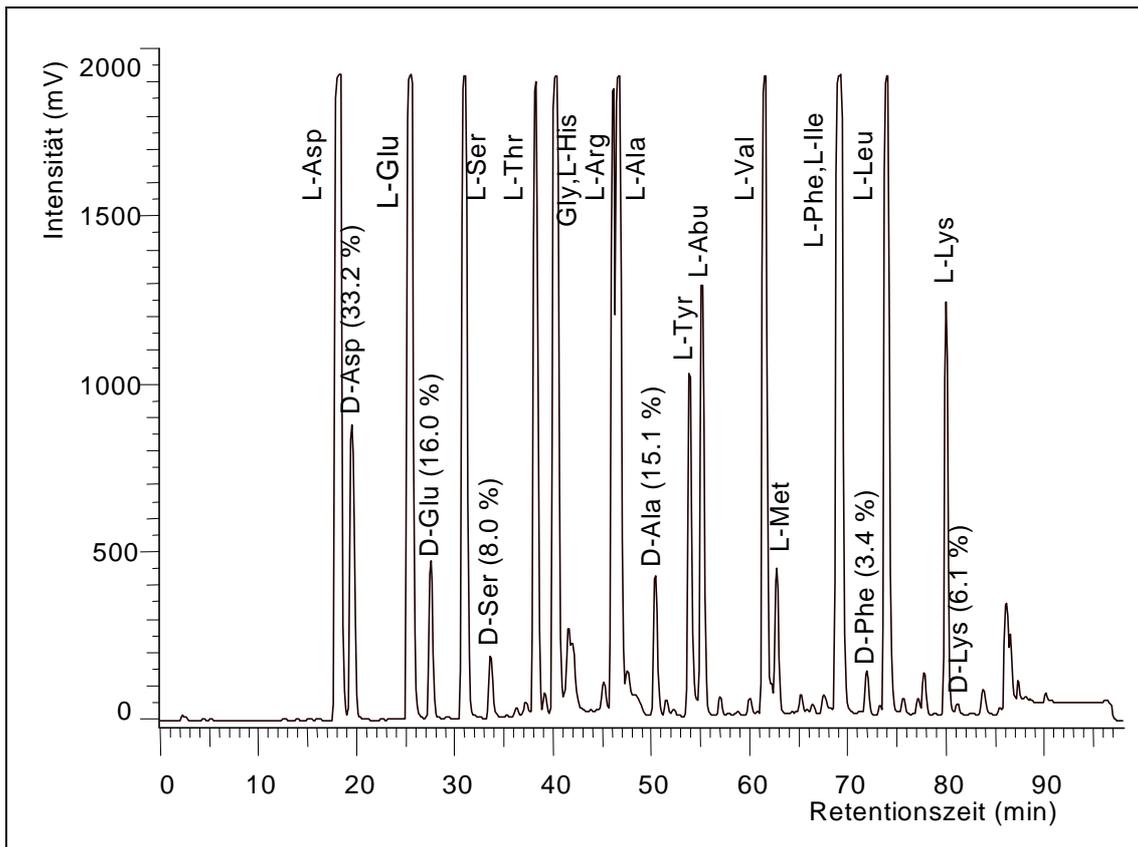


Abb. 4-11: HPLC-Chromatogramm einer gemischten Sojasauce (B4) nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom . Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.3.2

4.2.3 D-Aminosäuren in Miso

Tabelle 4-13 zeigt die relativen Gehalte an D-AS in den untersuchten Misoproben. Ausgewählte Chromatogramme der Proben sind in der Abbildung 4-12 dargestellt. Die Spektren der AS in beiden Probenarten unterscheiden sich nur wenig. In allen Misoproben wurde D-Ala, D-Asp, D-Glu, D-Pro, D-Ser, D-Leu und D-Lys gefunden. Durch Umkehr der Elutionsfolge nach Derivatisierung mit OPA/IBDC konnten diese Befunde bestätigt werden (Chromatogramm nicht gezeigt). Die höchsten Relativgehalte wurden in allen Misoproben bei D-Ala (21,0 - 26,0 %) beobachtet, während der niedrigste Gehalt mit 12,1 % nur bei einer unter Zusatz von Weizen hergestellten

Misoprobe (B1) festgestellt werden konnte. In dieser Probe war der Anteil von Sojabohnen (23,0 %) als Ausgangsmaterial am niedrigsten und der Anteil von Weizen mit 14,4 % am höchsten. Zuvor konnte schon D-Ala als Major-AS sowohl in Sojabohnen (6,3 %) als auch in Sojabohnenkoji (24,7 %) festgestellt werden (siehe Kap. 4.2.1). Die Proben A1, A2 und B4, welche einen hohen Sojabonenanteil haben, wiesen eine Sojabohnenkoji ähnliche D-AS-Zusammensetzung.

Die Gehalte an D-Asp und D-Glu waren im Mittel mit 9,8 % und 7,2 % bei den Sojabohnenmiso etwas höher als die Gehalte in Weizenmiso (4,6 % und 4,4 %). Der Gehalt an D-Pro (2,7 - 3,3 %) war mit Ausnahme von Probe A1 bei allen Proben sehr ähnlich.

Tab. 4-13: Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in Miso, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C. [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$] (n=2)

Miso								
D-AS ¹⁾	Sojabohnenmiso				Weizenmiso			
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
Asp	-	4,5	12,6	12,3	4,6	1,0	6,7	6,2
Glu	7,4	5,8	4,8	10,8	2,4	2,1	3,9	9,3
Ser	9,3	3,8	0,7	4,8	1,7	0,6	2,4	1,6
Ala	26,0	21,4	21,0	21,4	12,1	22,4	22,4	22,1
Leu	-	4,6	6,7	-	-	-	-	3,0
Lys	-	3,0	1,3	-	4,0	-	-	3,6
Pro ²⁾	-	3,0	3,1	3,0	3,3	2,7	3,0	2,9

A1-A4, B1-B4 Angaben siehe Kap. 2.4.3; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ bestimmt mittels GC nach Derivatisierung mit *N*(O)-Pentafluorpropionyl-2-Propylester an Chirasil-L-Val; - nicht detektierbar

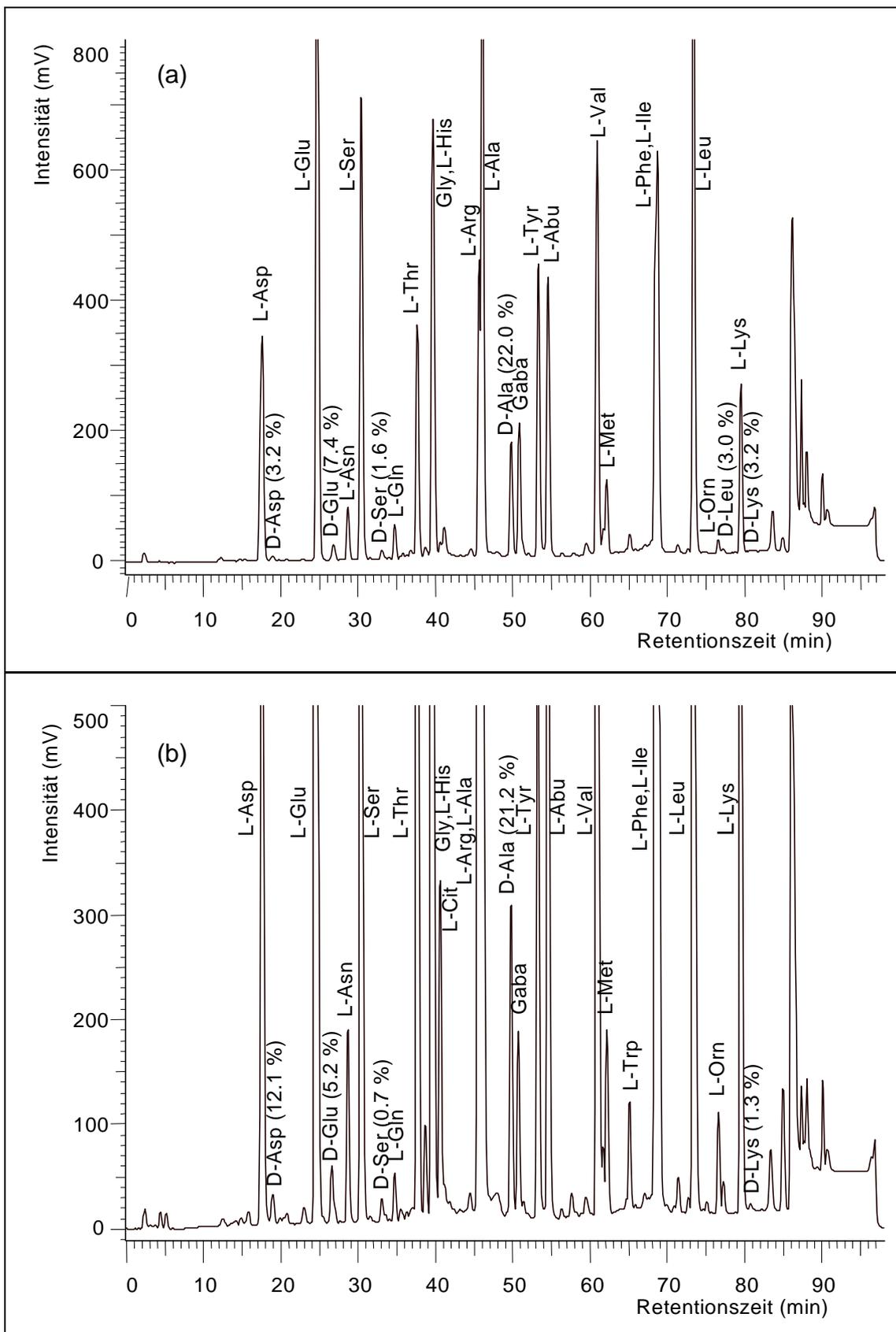


Abb. 4-12: HPLC-Chromatogramme der Misoproben (a) A3 und (b) B4 nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom . Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.3.2

4.2.4 D-Aminosäure in Pepperonipasten

Die relativen D-Aminosäuregehalte in den Pepperonipasten sind in Tabelle 4-14 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, daß alle Proben D-Ala (1,6 - 30,6 %), D-Asp (3,6 - 10,3 %), D-Glu (2,8 - 15,1 %) und D-Leu (0,8 - 3,6 %) aufweisen. Der Gehalt an D-Ala war bei allen Reispepperonipasten (11,8 - 30,6 %) deutlich höher als bei den Weizenpepperonipasten (1,6 - 9,5 %), während der Gehalt an D-Asp in allen Pepperonipasten aus Weizen höher als der Gehalt an D-Ala war. Auffallend war das Vorkommen von Leu (0,8 - 3,6 %) in allen Proben. Die Chromatogramme ausgewählter Proben sind in der Abbildung 4-13 aufgeführt.

Tab. 4-14: Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in Pepperonipasten, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = $D \cdot 100 / (D+L)$]

Pepperonipasten								
D-AS ¹⁾	Reispepperonipasten				Weizenpepperonipasten			
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
Asp	7,9	4,0	9,2	3,8	3,6	6,9	10,3	7,6
Glu	15,1	5,7	5,3	5,6	3,2	2,8	3,3	5,8
Ala	11,8	11,8	12,7	30,6	9,5	4,0	4,9	1,6
Leu	2,9	3,2	3,6	2,5	1,4	1,0	0,8	0,9
Lys	-	-	7,2	8,3	2,3	-	7,3	9,5
Pro ²⁾	-	4,0	5,8	5,2	3,0	-	-	5,3

A1-A4, B1-B4 Angaben siehe Kap. 2.4.4;¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ bestimmt mittels GC nach Derivatisierung mit *N*(O)-Pentafluorpropionyl-2-Propylester an Chirasil-L-Val; - nicht detektierbar

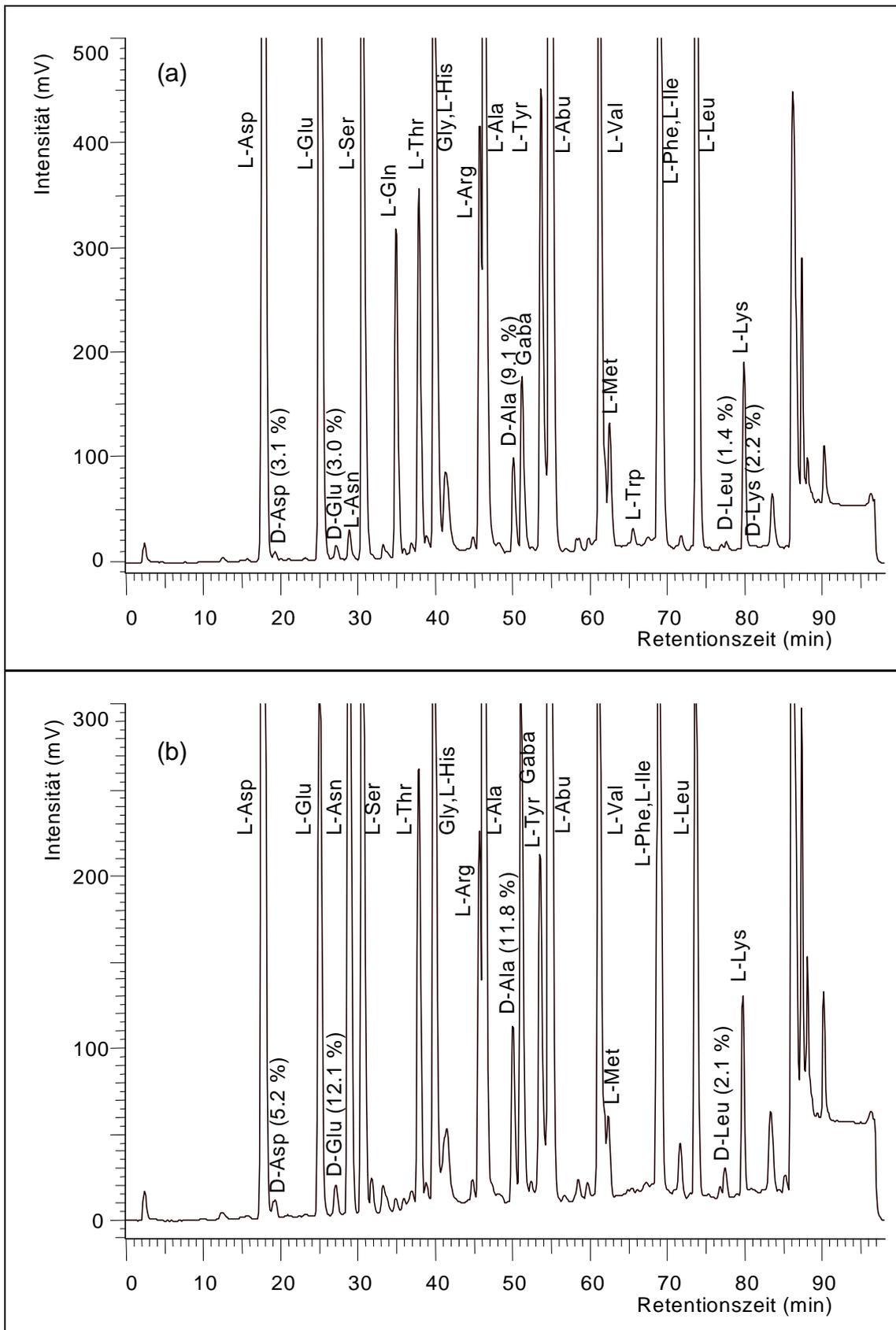


Abb. 4-13: HPLC-Chromatogramme der Pepperonipasten (a) A1 und (b) B1 nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom . Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.3.2

4.2.5 D-Aminosäure in Sake

Die relativen Gehalte an D-AS in Saken sind in Tabelle 4-15 zusammengefasst. Alle Proben zeigten einen hohen Gehalt an D-Asp (5,3 – 5,7 %), D-Glu (3,5 - 12,9 %), D-Asn (7,0 -33,6 %) und D-Ser (4,6 - 12,2 %). D-Leu (4,3 %) konnte nur in Probe A2 detektiert werden. Die Probe A3, welche nach der Angabe des Herstellers 5 Jahre alt war, wies einen besonders hohen Gehalt an D-Asn (33,6 %) auf. Bemerkenswert war in dieser Untersuchung die Detektion von D-Asn bei allen Proben. Das Chromatogramm einer Sakeprobe ist in Abbildung 4-14 gezeigt.

Tab. 4-15: Relativgehalt [%] an D-Aminosäuren in Sake A1-A3, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBL(D)C (n=2). [% D = D*100/(D+L)]

D-AS ¹⁾	Sake				\bar{x} ³⁾
	A1	A2	A3		
Asp	5,7	5,7	5,3		5,6
Glu	3,5	5,3	12,9		14,1
Asn	9,9	7,0	33,6		7,2
Ser	11,5	12,2	4,6		12,2
Ala	2,2	12,0	12,9		9,8
Leu	-	4,3	-		-
Pro ²⁾	2,1	2,0	1,7		1,9

A1-A3 Angaben siehe Kap. 2.4.5; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ bestimmt mittels GC nach Derivatisierung mit N(O)-Pentafluorpropionyl-2-Propylester an Chirasil-L-Val; ³⁾ Mittelwert nur für die in allen Proben vorkommenden D-AS; - nicht detektierbar

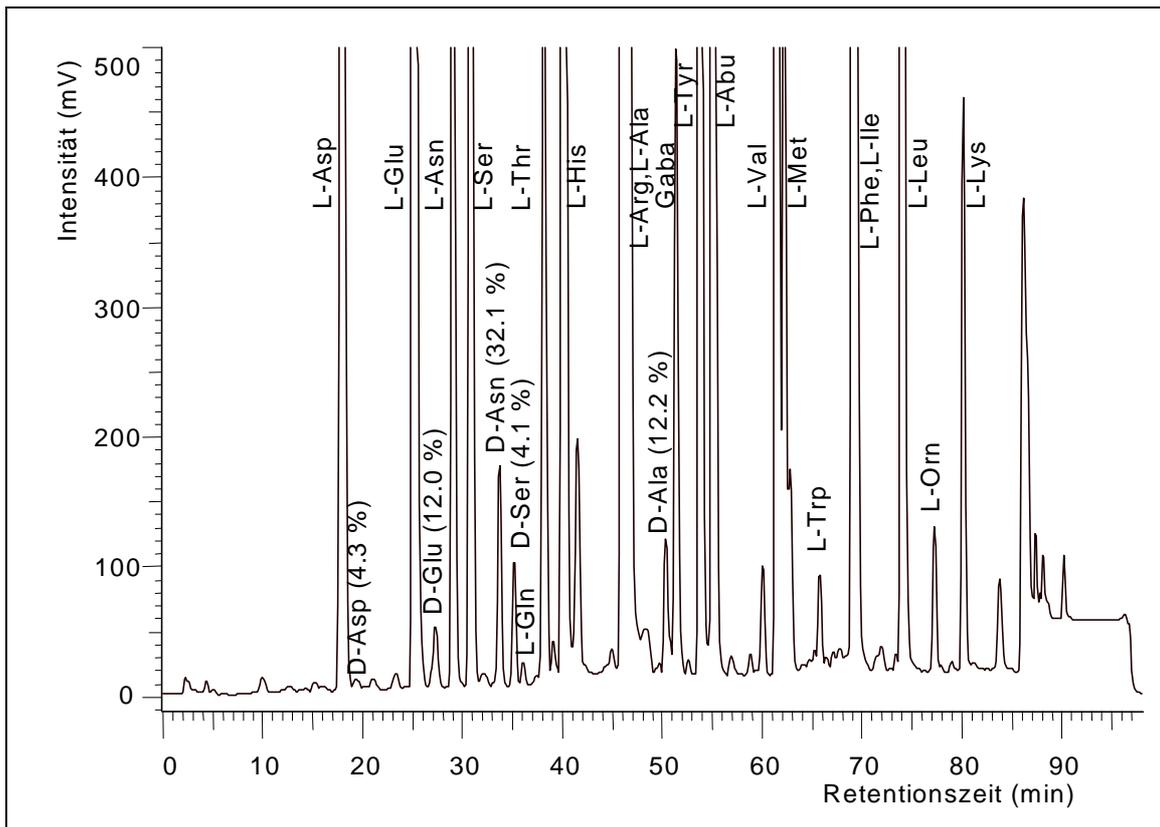


Abb. 4-14: HPLC-Chromatogramm einer 5 Jahre alten Sakeprobe (A3) nach Derivatisierung mit OPA/IBLC mittels HPLC-System LaChrom . Chromatographische Bedingungen siehe Kap. 3.3.2

4.2.6 D-Aminosäure in Fischsaucen

Die relativen Gehalte an detektierbaren D-AS in Fischsaucen sind in Tabelle 4-16 zusammengefasst. Die untersuchten Fischsaucen zeigten ein breites D-AS-Spektrum. D-Asp (3,8 - 19,8 %), D-Glu (1,7 - 5,5 %), D-Ser (1,3 - 22,3 %), D-Ala (0,4 - 3,5 %) und D-Pro (4,2 - 8,0 %) wurden in allen Proben gefunden, wobei D-Asp und D-Pro die Major-AS darstellten. D-Lys (4,5 %) war nur in Probe A4 vorhanden. Besonders die Probe A4, bei der die höchste Menge des Fischextraktes deklariert war, zeigte höhere Gehalte an D-Asp, D-Glu und D-Ser im Vergleich zu den anderen Proben. Das Chromatogramm einer ausgewählten Probe ist in Abbildung 4-15 zu sehen.

4.3 Analytik biogener Amine

Im folgenden werden alle Ergebnisse der Analysen auf biogene Amine mittels HPLC nach Derivatisierung mit PNZ-Cl dargestellt. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen und der Mittelwert in mg/kg bzw. mg/l ermittelt.

4.3.1 Sojabohnen und Sojabohnenkoji (Rohstoffe)

Die Absolutgehalte an BA in Rohstoffen sind in Tabelle 4-17 dargestellt. Die Rohstoffe zur Herstellung der fermentierten Sojaprodukten (Sojabohnen und Sojabohnenkoji) zeichneten sich durch ein sehr enges Aminspektrum aus. Lediglich Spd und Spm ließen sich in beiden Proben auswerten. In Sojabohnenkoji wurde zusätzlich Tym (3 mg/kg) in geringen Mengen detektiert. Chromatogramme der untersuchten Rohstoffen sind in Abbildung 4-16 dargestellt.

Tab. 4-17: Absolutgehalt [mg/kg] an biogenen Aminen in Rohstoffen (Sojabohnen und Sojabohnenkoji), ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2).

Rohstoffe		
BA ¹⁾	Sojabohnen	Sojabohnenkoji
Tym	-	3,4
Spd	2,3	14,9
Spm	1,2	3,7
Σ BA ²⁾	3,5	21,9

¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ Gesamtgehalt [mg/kg]; - nicht detektierbar

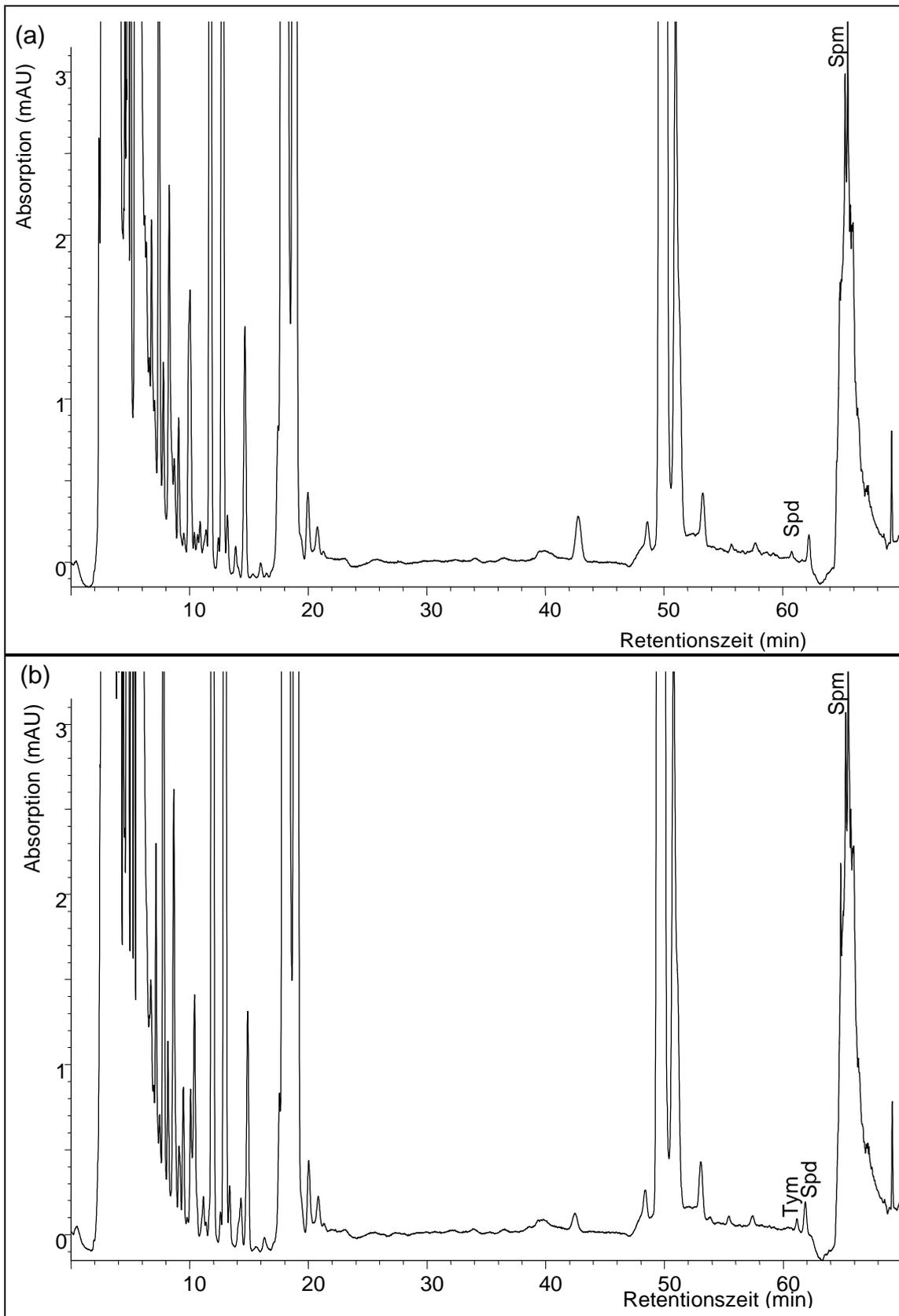


Abb. 4-16: HPLC-Chromatogramme von (a) Sojabohnen und (b) Sojabohnenkofu nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe 3.4.1

4.3 2 Biogene Amine in Sojasaucen

Die Ergebnisse der BA-Analyse der Sojasaucenproben sind als Absolutgehalte in mg/l in Tabelle 4-18 dargestellt. Bei den Untersuchungen der Sojasaucen ergab sich ein breites Aminspektrum. Die Gesamtgehalte der BA lagen zwischen 80 mg/l und 1215 mg/l für fermentierte Sojasaucen sowie zwischen 94 mg/l und 632 mg/l für gemischte Sojasaucen. In allen Sojasaucen konnten Him (4 - 239 mg/l), Put (6 - 461 mg/l) und Tym (2 - 568 mg/l) nachgewiesen werden, wobei die Gehalte an diesen Aminen in den Proben A2 und A6 der fermentierten Sojasaucen sowie in B3 der gemischten Sojasaucen relativ hoch waren. Besonders die Probe A2 zeichnete sich durch sehr hohe Gehalte an Him (239 mg/l), Put (321,9 mg/l) und Tym (567,8 mg/l) aus. Die Polyamine Spd und Spm konnten in allen gemischten und fermentierten Sojasaucen mit Ausnahme von A1 in unterschiedlichen Konzentration detektiert werden. Ausgewählte Chromatogramme der Proben sind in der Abbildung 4-17 gezeigt.

Tab. 4-18: Absolutgehalt [mg/l] an biogenen Aminen in Sojasaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2).

Sojasaucen										
BA ¹⁾	fermentiert						gemischt			
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4
Him	3,6	239,1	39,8	18,9	25,1	124,0	12,5	9,4	141,3	35,0
Put	154,1	321,9	460,8	15,2	13,8	11,6	6,4	12,1	46,8	58,3
Pea	4,9	64,4	17,0	-	-	4,9	1,0	11,3	44,7	13,5
Oct	11,9	4,7	67,9	6,1	30,1	3,0	7,6	32,5	-	8,9
Cad	9,5	5,7	-	5,1	-	0,6	1,5	-	86,1	-
Tym	38,8	567,8	162,2	10,8	9,0	1,9	38,4	16,7	131,2	75,7
Spd	-	7,7	15,5	2,2	9,0	12,8	19,6	21,0	16,9	18,6
Spm	-	3,2	4,1	2,8	5,2	4,3	7,2	6,0	23,8	12,0
Σ BA ²⁾	225,6	1214,5	794,6	79,6	92,2	286,5	94,2	111,1	632,3	255,5

A1-A6, B1-B4 Angaben siehe Kap. 2.4.2; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ Gesamtgehalt [mg/l]; - nicht detektierbar

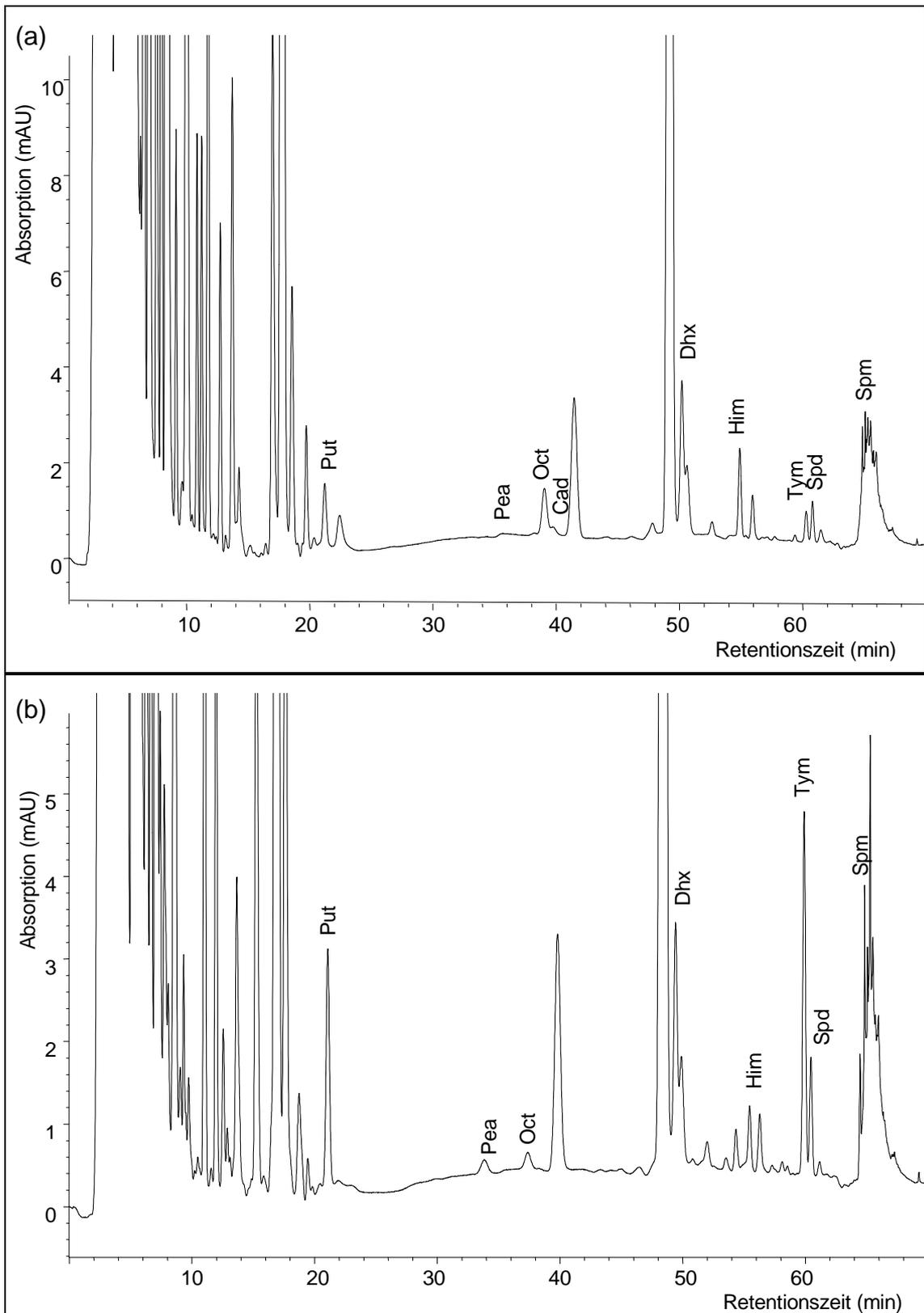


Abb. 4-17: HPLC-Chromatogramme der (a) fermentierten Sojasauceprobe A2 und der (b) gemischten Sojasauceprobe B4 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe 3.4.1

4.3.3 Biogene Amine in Miso

Es wurden zwei verschiedene Misogruppen untersucht, die sich in den verwendeten Rohstoffen (Sojabohnen und Sojabohnen mit Weizenzusatz) unterschieden. Die Ergebnisse der BA-Analyse der Misoproben sind detailliert in Tabelle 4-19 aufgeführt. Insgesamt wurden 8 BA (Him, Put, Pea, Oct, Cad, Tym, Spd, Spm) in Miso detektiert. Die Gesamtgehalte der mit Sojabohnen hergestellten Miso lag zwischen 75 mg/kg und 1051 mg/kg sowie zwischen 132 mg/kg und 1085 mg/kg für Miso mit Weizenzusatz. Auffallend waren die hohen Gehalte an Him (99 - 321 mg/kg), Put (108 - 390 mg/kg) und Tym (217 - 417 mg/kg) bei den Proben A3, B2 und B4. Oct und Cad wurden in allen Proben in sehr unterschiedlichen Konzentration nachgewiesen. Die Polyamine Spd und Spm waren mit Ausnahme von Misoprobe A1 nur in geringen Mengen vorhanden. Ausgewählte Chromatogramme der Proben sind in der Abbildung 4-18 gezeigt.

Tab. 4-19: Absolutgehalt [mg/kg] an biogenen Aminen in Miso, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2).

Miso								
BA ¹⁾	Sojabohnenmiso				Weizenmiso			
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
Him	20,4	16,5	98,5	5,7	13,8	321,3	29,7	177,0
Put	63,2	14,4	389,3	14,3	26,9	107,6	69,1	383,3
Pea	24,2	18,6	131,6	3,8	22,8	8,0	79,2	47,0
Oct	13,1	5,0	48,1	2,9	6,4	8,6	53,2	8,8
Cad	1,7	17,0	13,7	2,3	1,3	0,7	-	7,1
Tym	72,3	16,7	364,1	18,3	32,1	216,6	97,8	416,7
Spd	-	0,2	2,0	3,4	0,3	9,9	0,8	4,1
Spm	3,3	3,2	3,2	24,7	28,4	3,9	2,7	40,7
Σ BA ²⁾	198,2	91,6	1050,5	75,4	132,0	698,0	332,5	1084,7

A1-A4, B1-B4 Angaben siehe Kap. 2.4.3; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ Gesamtgehalt [mg/kg]; - nicht detektierbar

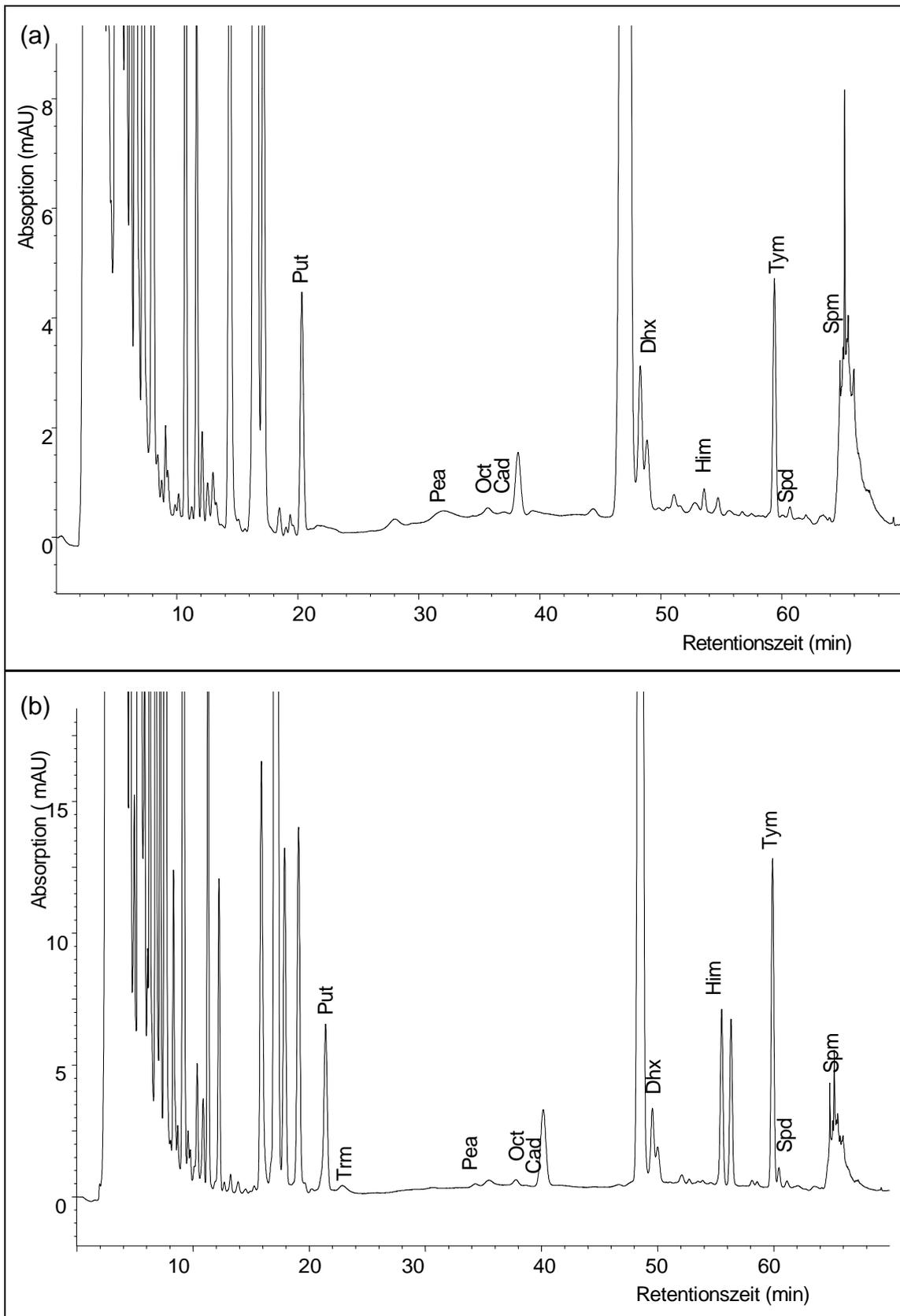


Abb. 4-18: HPLC-Chromatogramme der Misoproben (a) A1 und (b) B2 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe 3.4.1

4.3.4 Biogene Amine in Pepperonipasten

Es wurden zwei verschiedene Probengruppen untersucht, die sich in den verwendeten Rohstoffen (Sojabohnenkaji mit Reis bzw. Weizen) unterscheiden. Die Ergebnisse der BA-Analyse der Pepperonipasten sind detailliert in mg/kg in Tabelle 4-20 aufgeführt. Die Proben der Pepperonipasten zeichneten sich durch ein sehr enges Aminospektrum aus. Insgesamt konnten 6 BA (Him, Put, Pea, Tym, Spd, Spm) in Proben detektiert, wobei die meisten nur eine geringe Konzentration aufwiesen. Die Gesamtamingehalte von Reispfefferonipastenproben lag zwischen 29 mg/kg und 155 mg/kg, die für Pfefferonipasten mit Weizen zwischen 18 mg/kg und 169 mg/kg. Die Proben A3 und B2 wiesen einen hohen Gesamtgehalt von 155 mg/kg bzw. 168 mg/kg durch den hohen Anteil von Him und Tym auf, welche zusammen 138 mg/kg bzw. 146 mg/kg ausmachten. Die Polyamine Spd (0,4 - 7 mg/kg) und Spm (2 - 4 mg/kg) wurden in allen Proben mit Ausnahme von Proben B1 und B2 gefunden. Ausgewählte Chromatogramme der Proben sind in der Abbildung 4-19 gezeigt.

Tab. 4-20: Absolutgehalt [mg/kg] an biogenen Aminen in Pfefferonipasten A1-A4, B1-B4, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2).

Pepperonipasten								
BA ¹⁾	Reispfefferonipasten				Weizenpfefferonipasten			
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
Him	9,2	9,1	77,2	3,3	13,8	69,4	7,6	28,7
Put	-	-	3,8	3,9	1,7	6,8	3,8	5,0
Pea	3,0	8,2	2,1	-	-	12,7	6,5	8,7
Tym	13,3	12,3	60,4	9,0	-	77,0	14,2	10,6
Spd	2,2	1,9	6,9	2,8	2,3	-	0,4	1,0
Spm	1,7	5,7	4,3	4,3	-	2,9	2,7	1,7
Σ BA ²⁾	29,5	34,1	154,6	23,8	17,8	168,8	35,2	55,7

A1-A4, B1-B4 Angaben siehe Kap. 2.4.4; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ Gesamtgehalt [mg/kg]; - nicht detektierbar

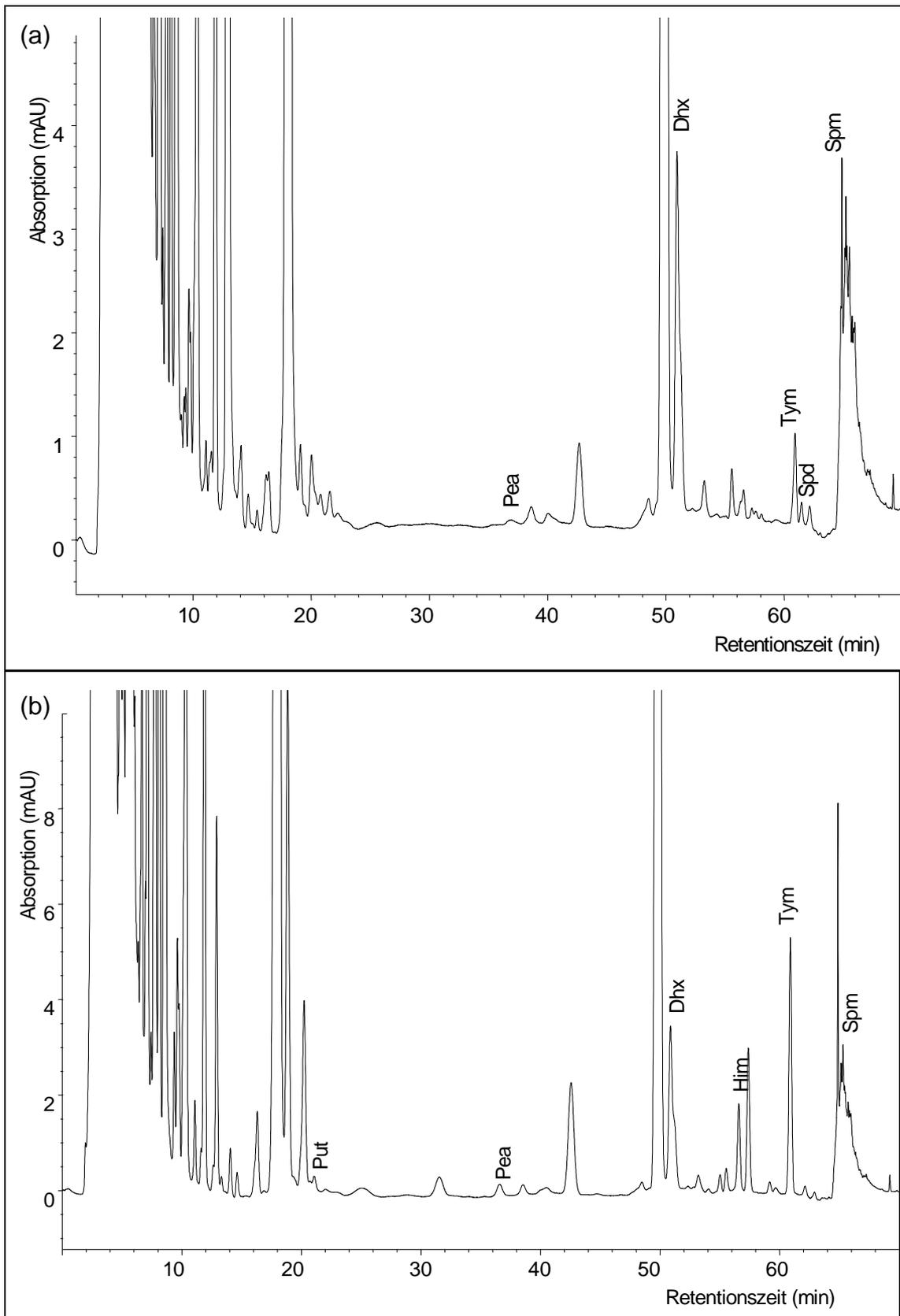


Abb. 4-19: HPLC-Chromatogramme der Pepperonipasten (a) A1 und (b) B2 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe 3.4.1

4.3.5 Biogene Amine in Sake

Die Ergebnisse der BA-Analyse der Sake sind detailliert in Tabelle 4-21 aufgeführt. Die Sake zeichnete sich durch ein sehr geringes Aminspektrum aus. Lediglich Pea (1 - 2 mg/l) und Ocp (1 - 5 mg/l) wurden in allen Proben gefunden, wobei die Probe A3 zusätzlich Tym (1 mg/l), Spd (3 mg/l) und Spm (7 mg/l) aufwies. Der Gesamtgehalt an BA lag zwischen 3 mg/l und 12 mg/l. Ein ausgewähltes Chromatogramm ist in Abbildung 4-20 gezeigt.

Tab. 4-21: Absolutgehalt [mg/l] an biogenen Aminen in Sake, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2).

Sake				
BA ¹⁾	A1	A2	A3	\bar{x} ²⁾
Pea	1,9	1,2	0,9	1,3
Oct	4,6	1,6	1,2	2,5
Spd	-	-	2,6	-
Spm	-	-	6,7	-
Σ BA ³⁾	6,5	2,9	12,0	7,1

A1-A3 Angaben siehe Kap. 2.4.5; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ Mittelwert nur für die in allen Probenarten vorkommenden BAs; ³⁾ Gesamtgehalt [mg/l]; - nicht detektierbar

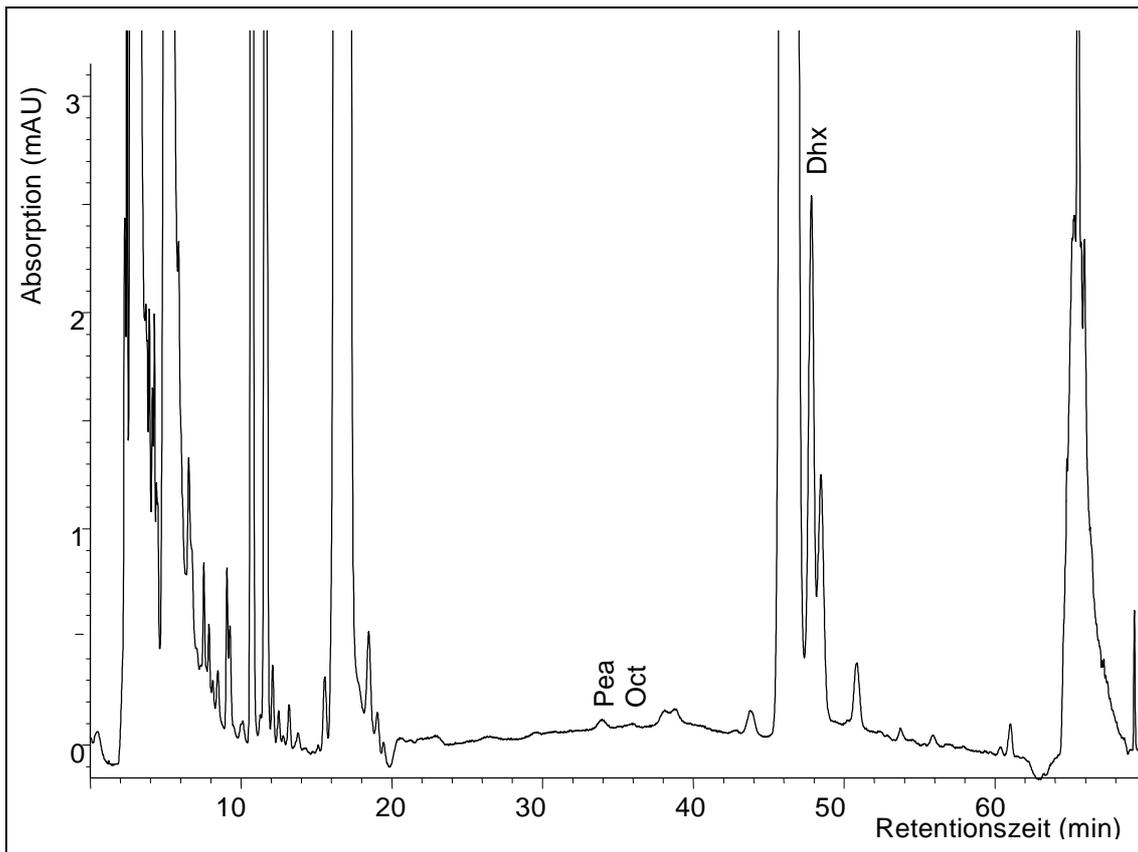


Abb. 4-20: HPLC-Chromatogramm einer Sakeprobe A1 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe 3.4.1

4.3.6 Biogene Amine in Fischsaucen

Die Fischsaucen enthielten neben dem breitesten Aminspektrum aller untersuchten Proben auch hohe Absolutgehalte an BA (Tabelle 4-22). Der Gesamtgehalt an BA lag zwischen 160 mg/kg und 1204 mg/kg. Auffallend war, daß alle Proben besonders hohe Gehalte an Trm (225 - 281 mg/kg), Oct (39 - 443 mg/kg) und Tym (82 - 373 mg/kg) aufwiesen, wobei Cad als einziges Amin nicht detektiert wurde.

Im Gegensatz dazu war der durchschnittliche Gehalt für Him mit 7 mg/kg bei allen Proben gering. In dieser Untersuchung zeigte sowohl der Gesamtgehalt als auch der

Gehalt an Einzelaminen eine steigende Tendenz nach der eingesetzten Menge an Fischextrakt. Ein ausgewähltes Chromatogramm ist in Abbildung 4-21 dargestellt.

Tab. 4-22: Absolutgehalt [mg/kg] an biogenen Aminen in Fischsaucen, ermittelt durch HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl (n=2).

Fischsaucen					
BA ¹⁾	A1	A2	A3	A4	\bar{x} ²⁾
Put	20,1	49,5	14,2	13,9	24,4
Trm	-	230,3	225,4	280,8	184,1
Pea	5,6	34,6	46,9	42,5	32,4
Oct	39,0	250,9	199,3	442,6	233,0
Cad	-	-	-	-	-
Him	3,5	7,9	7,3	7,1	6,5
Tym	81,5	218,9	365,5	372,6	259,6
Spd	5,7	10,8	14,5	9,6	10,1
Spm	4,7	8,2	10,3	8,6	8,0
Σ BA ³⁾	160,1	811,2	909,0	1203,5	770,9

A1-A4 Angaben siehe Kap. 2.4.6; ¹⁾ Angeordnet nach Elutionsfolge; ²⁾ Mittelwert nur für die in allen Probenarten vorkommenden BAs; ³⁾ Gesamtgehalt [mg/kg]; - nicht detektierbar

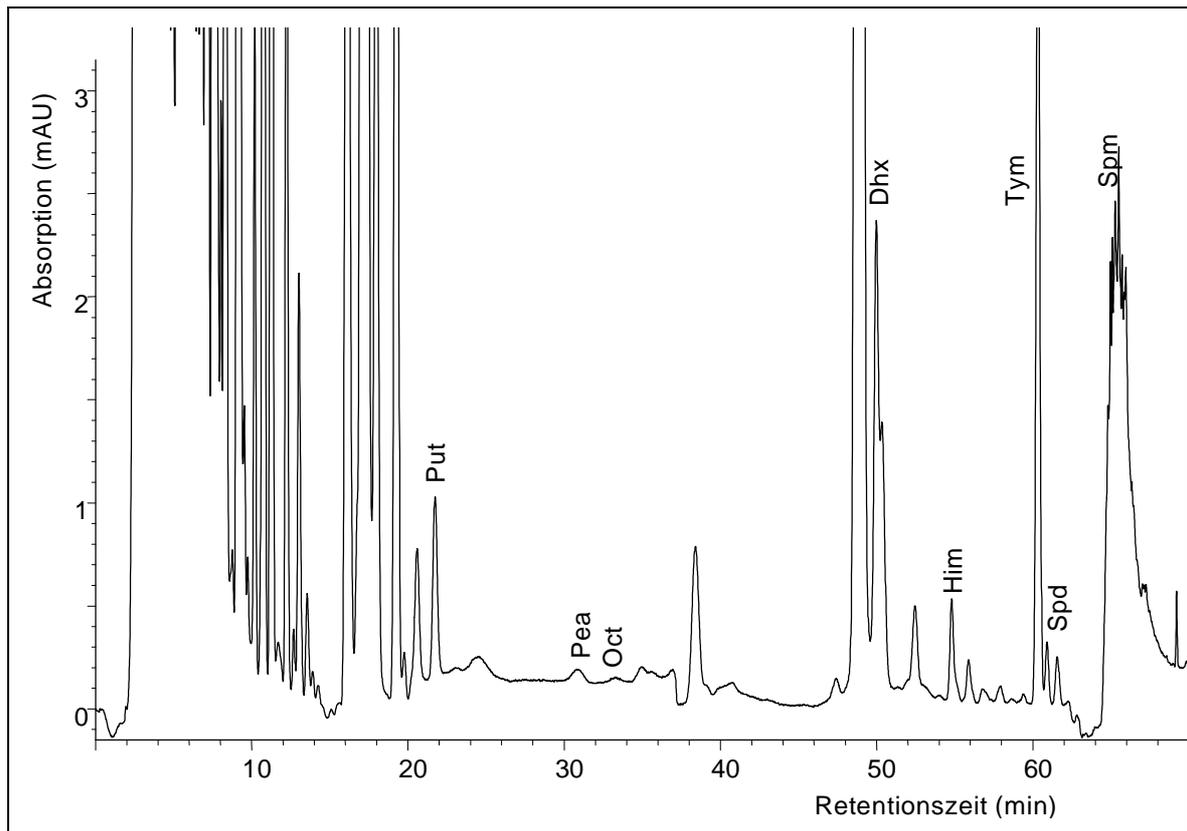


Abb. 4-21: HPLC-Chromatogramm einer Fischsaucprobe A1 nach Vorsäulenderivatisierung mit PNZ-Cl. Chromatographische Bedingungen siehe 3.4.1

5 DISKUSSION

5.1 Rohmaterialien zur Herstellung der fermentierten Sojaprodukten

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten fermentierten Sojaprodukte (Sojasaucen, Miso und Peppertonipasten) variieren durch die zur Fermentation eingesetzten Rohstoffe, Mikroorganismen und Verarbeitungsprozesse. Die Sojaprodukte bestanden überwiegend aus den gleichen Rohstoffen (Sojabohnen und Sojabohnenkoji) und es wurde, je nach Produkt, zusätzlich Getreide wie Weizen, Reis oder Gerste eingesetzt (siehe Kap. zw. 2.4). Die Kojiherstellung bildet dabei meist die erste Stufe im Herstellungsprozeß fermentierter Sojaprodukte. Koji ist reich an verschiedenen Hydrolasen, die durch eine Pilzfermentation entstehen. Zum besseren Vergleich wurden die Hauptrohstoffe auf ihren freien AS-Gehalt, den entsprechenden D-Enantiomeren und BA untersucht.

5.1.1 Achirale Analytik der Aminosäuren in Rohmaterialien

Bei der Untersuchung der unfermentierten Sojabohnen ergab sich ein breites Aminosäurespektrum, wobei Asp, Glu, Arg und Tyr mit dem Anteil zwischen 11,2 - 16,6 % am Gesamtgehalt dominierend waren. Sojabohnenkoji zeigte dasselbe AS-Muster wie die Sojabohnen, wobei zusätzlich Orn und Cit in hohen Mengen detektiert wurden. Da diese beiden nichtproteinogene AS in Sojabohnen nicht nachgewiesen werden konnten, kann ihr Vorkommen auf eine Pilzfermentation zurückgeführt werden. Nach einer Untersuchung von LUH [136] konnten diese AS in unfermentiertem Weizen ebenfalls nicht festgestellt werden, welcher auch einer der Hauptrohstoffen zur Herstellung von fermentierter Sojaprodukte darstellt. Solche nichtproteinogene AS sind fast immer Derivate der proteinogenen AS u.a. von Arg, und spielen eine Rolle als Zwischenprodukte im Stoffwechsel der proteinogenen AS [114,115,178-182].

Aus diesem Grunde könnten bestimmte nichtproteinogene AS als Indikator für mikrobielle Aktivität in fermentierten Lebensmitteln dienen.

5.1.2 Chirale Analytik der Aminosäuren in Rohmaterialien

In den unfermentierten Sojabohnen, welche als Ausgangsmaterial zur Sojabohnenkoiherstellung dienen, wurden die D-Enantiomeren von Ala, Asp und Glu gefunden. D-Ala wies mengenmäßig mit 7,8 % den höchsten relativen Anteil auf. Das Auftreten von D-AS ist entweder auf eine gewisse mikrobielle Kontamination oder auf einen natürlichen Gehalt des Getreides an freien oder *N*-acylierten D-Aminosäuren zurückzuführen [183-194].

BRÜCKNER und WESTHAUSER [195] fand in einer Untersuchung von Pflanzenmaterialien wie Samen und Keimlingen D-Asp, D-Glu und D-Ala in gewissen Mengen und unterschiedlichen Verteilungen. D-Ala wurde dabei sowohl in Sojabohnensamen (2,2 %) als auch in Sojabohnenkeimlingen (1,4 %) detektiert. FRAHN und ILLMAN [184] beschrieben das Vorkommen von D-Ala sowie D-Ala-D-Ala in *Phalaris tuberosa*, einer Gräserart. Darüberhinaus konnte freies D-Glu sowie freies D-Asp neben freiem D-Ala in Erbsenkeimlingen gefunden. In den überwiegenden Fällen des beschriebenen Vorkommens von D-AS in Pflanzen lagen diese jedoch nicht in der freien Form, sondern konjugiert vor. So gelang ZENK und SCHERF [185] der Nachweis von *N*-Malonyl-D-Trp in mehreren Arten von Samenpflanzen und einem Farn, während *N*-Malonyl-D-Ala in Erbsenkeimlingen gefunden werden konnte [186,187]. Eine weitere Form des konjugierten D-Ala, γ -L-Glutamyl-D-Ala, wurde von OGAWA et al. [188,189] in Erbsenkeimlingen beschreiben [188-191].

Über die Herkunft der D-AS in Pflanzen können bislang keine eindeutige Erklärungen gefunden werden. Da D-AS sehr leicht von Pflanzen aufgenommen werden, könnten diese aus der Tätigkeit von Bodenmikroorganismen stammen, was vor allem das Vorkommen von D-Ala, D-Asp und D-Glu in Pflanzen erklärt würde, da diese D-AS im Metabolismus von MO als Bausteine der Zellwand eine wichtige Rolle spielen (siehe Kap. 1.1).

Im Sojabohnenkoi, das üblicherweise mit Hilfe von Pilzen u.a. *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus sojae* hergestellt wird, fanden sich wie in Sojabohnen D-Ala, D-Asp

und D-Glu. Zusätzlich traten hier D-Ser, D-Phe, D-Leu und D-Pro auf. Im Vergleich zu den nativen Sojabohnen steigen im fermentierten Sojabohnenkochi die relativen Gehalte von D-Ala, D-Asp und D-Glu an. Der relative Gehalt von D-Glu erhöht sich hierbei um mehr als das zehnfache. D-Ala hat mit 24,8 % den höchsten relativen Anteil.

Im wesentlichen ist der hohe Gehalt an D-AS in Sojabohnenkochi auf die mikrobielle Stoffwechselaktivität während der Pilzfermentation zurückzuführen. Im Gegensatz zu der industriellen Kochiherstellung, die im allgemeinen 2-3 Tage dauert, beträgt die Fermentationsdauer bei der natürlichen, traditionellen Herstellung bis zu einem Monat. Während dessen kann eine mikrobielle Kontamination nicht ausgeschlossen werden kann.

5.1.3 Biogene Amine in Rohmaterialien

In Sojabohnen wurden lediglich Spd (2,3 mg/kg) und Spm (1,2 mg/kg) gefunden. Da Sojabohnen ein Hauptrohstoff zur Herstellung der fermentierten Sojaprodukte ist, können die hohe Gehalte an BA in Sojaprodukten durch deren hohen Proteingehalte sowie der verschiedenen MO, die an Fermentation beteiligt sind, erklären. Durch die Pilzfermentation stiegen die Gehalte an Spd und Spm in Sojabohnenkochi an und Tym (3,4 mg/kg) wurde zusätzlich detektiert.

5.2 Fermentierte Sojaprodukte

5.2.1 Sojasaucen

Zu den Qualitätskriterien für Sojasaucen zählen im allgemeinen Fermentation, Reifungsdauer und Rohstoffmischung sowie Mischungsgrad bei gemischten Sojasaucen. In der Regel gelten fermentierte Sojasaucen als hochwertiger im Vergleich zu nichtfermentierten Produkten wie z.B. gemischte Sojasaucen. Nach dem „Japanese Agricultural Standard (JAS)“ werden Sojasaucen in mehrere Typen eingeteilt und

nach Qualitäten auf diverse Grade klassifiziert. Japanische Sojasaucen der höchsten Qualitätsstufen (spezieller Grad) z.B. Koikuchi-Typ werden aus gleichen Anteilen an Sojabohnen und Weizen und ausschließlich durch Fermentation hergestellt. „The Korean Industrial Standard (KIS)“ klassifiziert Sojasaucen nach unterschiedlicher Qualität ebenfalls in mehrere Stufen und Grade. Als Merkmale zur Charakterisierung der Sojasaucen werden in beiden Ländern Gesamtstickstoffgehalt, Formolzahl, pH-Wert, Farbe und Aroma vorgeschrieben, welche jedoch keine konkreten Aussagen zur Qualität ermöglichen. Aus diesem Grunde werden einige Perspektiven zur möglichen Qualitäts- und Authentizitätskontrolle anhand der vorliegenden Analyseergebnisse aus achiraler und chiraler AS-Analytik sowie BA-Analyse dargestellt.

5.2.1.1 Achirale Analytik der Aminosäuren in Sojasaucen

Nach den Ergebnissen der vorliegenden achiralen Analyse der Aminosäuren zeigten sowohl fermentierte Sojasaucen (15 - 57 g/l) als auch gemischte Sojasaucen (75 - 396 g/l) einen hohen AS-Gehalt. Außerdem ergab sich bei allen Sojasaucen bedingt durch die Rohstoffe (Sojabohnen und Sojabohnenkoji), bei denen 20 bzw. 22 AS von 23 bestimmbar AS detektiert werden konnten, ein breites Aminosäurenspektrum. Auffällig war der sehr hohe Gehalt an Glu in allen Proben. Der Absolutgehalt an Glu lag zwischen 2,3 g/l und 40 g/l sowie der relative Anteil am Gesamtgehalt zwischen 10,0 % und 24,5 %.

Die Relative Anteile am Gesamtgehalt einiger AS änderten sich im Vergleich zu den Gehalten in den Rohstoffen in unterschiedlichem Maße. Besonders die Anteile von Arg und Tyr in fermentierten Sojasaucen (9,3 %) und Sojabohnenkoji (3,9 %) wurden im Verlauf der Fermentation erheblich herabgesetzt. Trp, das in Sojabohnen in hohen Mengen vorhanden war, konnte in keiner Probe detektiert werden. Besonders auffällig war die Detektion der nichtproteinogenen AS Cit und Orn, welche in Sojabohnen nicht festgestellt werden konnten. Dies kann durch eine mikrobielle Aktivität während der Fermentation der Sojabohnen erklärt werden.

In einer Arbeit von LUH [136] über die Änderung der AS während der Fermentation von Sojasaucen wurde beobachtet, daß Orn, welche weder in Sojabohnen noch in

Weizen vorhanden war, während der Fermentation durch Umwandlung von Arg in hohen Mengen entstanden war und Trp als Nährstoff für MO verbraucht wurde.

Im Falle der fermentierten Sojasaucen wurde in den vorliegenden Untersuchungen bei allen Proben sowohl Orn als auch Cit in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen (Abb. 5-1). Da Orn und Cit weder in Sojabohnen noch im Sojabohnenhydrolysat gefunden wurden, kann das Vorkommen dieser AS allein auf die Aktivität der MO während der Fermentation zurückgeführt werden.

Arg wird auf unterschiedlichen Abbauebenen durch MO metabolisiert. Dabei entstehen Orn und Cit als Zwischenprodukte des Arg-Stoffwechsels durch die Enzyme Arginase bzw. Arginindeiminase in MO (siehe Kap. 1.2.1). Damit besteht eine Möglichkeit, nicht fermentierte, durch Säurehydrolyse hergestellte, von den traditionell fermentativ produzierten Sojasaucen zu unterscheiden. Dies kann durch die Detektion der beiden AS in Sojabohnenkoji bestätigt werden, welches als Hauptrohstoff zur Herstellung der fermentierten Sojasaucen verwendet wird.

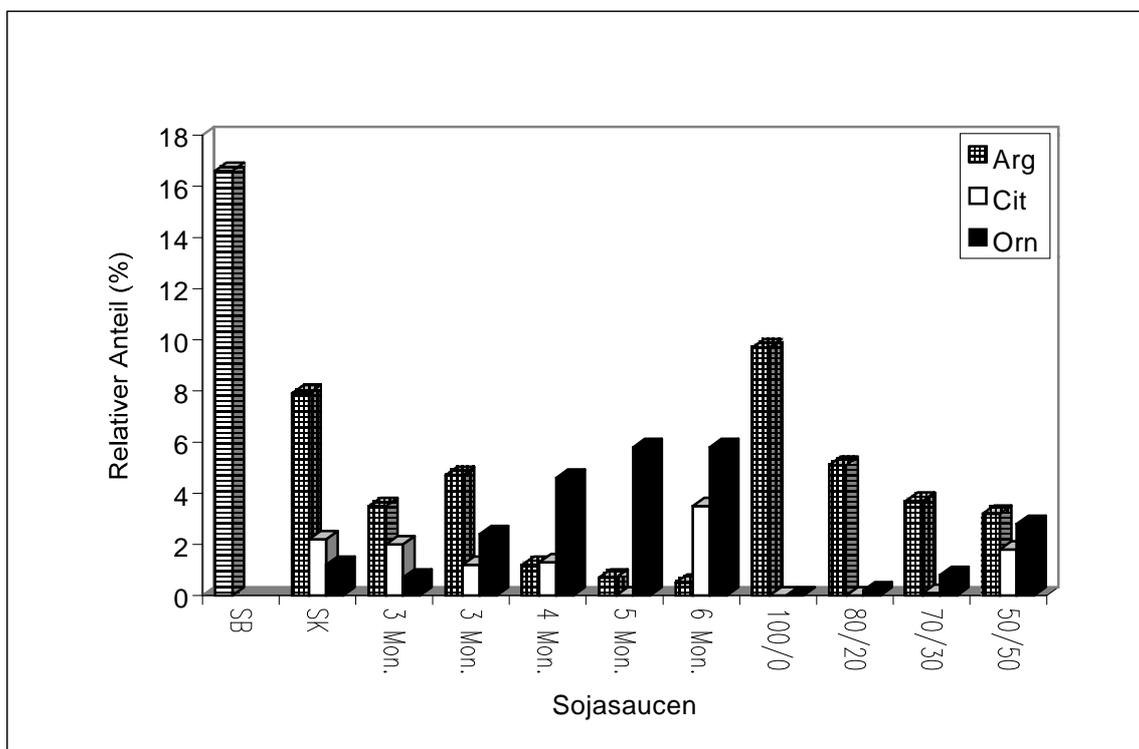


Abb. 5-1: Relativer Anteil von Arg, Cit und Orn am Gesamtgehalt in fermentierten und gemischten Sojasaucen; SB Sojabohnen; SK Sojabohnenkoji; Zeit: Fermentationsdauer; x/y: Mischungsverhältnis zw. Säurehydrolysierter und fermentierter Sojasaucen

Auch gemischte Sojasaucen wiesen geringe Mengen an Orn und Cit auf. Da diese AS nichtproteinogen sind, kann das Vorkommen der AS durch Säurehydrolyse von Sojabohnen ausgeschlossen werden. Dieser Befund wurde zusätzlich durch Untersuchung eines Sojabohnenhydrolysats, welche weder Orn noch Cit enthielt, bestätigt. Daher kann geschlossen werden, daß die Gehalte an Orn und Cit aus dem fermentierten Sojasaucenanteil der gemischten Sojasaucen stammen. Der Orn-Anteil war dabei im Vergleich zu dem Anteil von Arg bei allen gemischten Sojasaucen sehr niedrig. Somit können die beiden nichtproteinogenen AS Orn und Cit als Indikatoren zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle für Sojasaucen verwendet werden.

Alle fermentierten Sojasaucen zeigen eine positive Korrelation zwischen der Reifungsdauer und dem relativen Anteil von Orn (Abb. 5-1). Der relative Anteil von Orn am Gesamtgehalt der AS steigt mit zunehmender Reifungsdauer, während der Anteil von Arg sinkt. Die Relativgehalte von Orn lagen für die 3 Monate fermentierten Proben bei 0,7 % bzw. 2,4 % und für die 6 Monate fermentierte Probe bei 5,8 %.

Wie die Abbildung 5-1 zeigt, ist der Anteil von Arg am Gesamtgehalt bei den 3 Monate fermentierten Proben größer als der von Orn. Im Gegensatz dazu ist der Orn-Anteil bei anderen Sojasaucen (Fermentationsdauer zwischen 4 bis 6 Monaten) deutlich höher als der von Arg. Da eine Fermentationsdauer von 3 Monaten bei der Herstellung von fermentierten Sojasaucen in meisten Literaturstellen als Mindestdauer vorgeschlagen wurde, könnte das Verhältnis zwischen den Anteilen von Arg und Orn auch als ein Kriterium für die Bestimmung der Fermentationsdauer dienen.

5.2.1.2 Chirale Analytik der Aminosäuren in Sojasaucen

5.2.1.2.1 Fermentierte Sojasaucen

In allen untersuchten fermentierten Sojasaucenproben wurden erhebliche Mengen an D-AS gefunden (siehe Kap. 4.2.2). Dabei wurde festgestellt, daß D-Ala, D-Asp und D-Glu den Hauptanteil an den vorkommenden D-AS ausmachen. Es fällt auf,

daß die D-AS-Gehalte der einzelnen Proben sehr unterschiedlich sind, was vermutlich mit dem jeweiligen Herstellungsverfahren und der unterschiedlichen Fermentationsdauer zusammenhängt.

Für das Auftreten von freien D-AS in fermentierten Sojasaucen werden verschiedene Ursachen diskutiert. Ein Grund liegt in der Verwendung der mit Pilzen fermentierten Sojabohnenkoji bei der Herstellung der fermentierten Sojasaucen. Durch Untersuchung der Sojabohnen und des Sojabohnenkojis wurde bereits festgestellt, daß D-Ala, D-Asp und D-Glu in beiden Rohmaterialien vorkommen.

Außerdem hat das Vorkommen freier D-AS in Sojasaucen eine seiner Ursachen in der Verwendung von Bakterien und Hefen [138] als Grundlage für den anschließenden Fermentationsprozeß. Bakterien in Starterkulturen und ihr spezifischer Stoffwechsel wurden bereits durch zahlreiche Untersuchungen als Ursache für das Vorkommen von D-AS in bestimmten fermentierten Lebensmitteln angesehen.

Sowohl in Zellpoolextrakten als auch in Zellwandhydrolysaten [196,197] der Bakterien traten D-AS in hohen Mengen auf. Das Peptidoglycan Murein der Zellwände gram-positiver Bakterien ist aus Polysacchariden aufgebaut, die mit kurzkettigen Peptiden quervernetzt sind. Diese Oligopeptide enthalten u.a. D-AS, die aus den L-AS durch entsprechende Racemasen und Epimerasen entstehen. Darunter finden sich häufig D-Ala, D-Asp sowie D-Glu, seltener auch D-Lys, D-Orn, D-Ser sowie D-Pro. Darüber hinaus finden sich den meisten L-AS entsprechende freie D-AS im Zellpool bestimmter Bakterien.

Im Fall der untersuchten fermentierten Sojasaucen wurden D-Ala, D-Asp und D-Glu als dominierende D-AS detektiert. Weiterhin wurden D-Ser, D-Leu, D-Lys sowie D-Pro nachgewiesen. Dabei war der durchschnittliche, relative Anteil von D-Ala mit 31,4 % genau wie in den Rohstoffen am höchsten. *Streptococcus faecalis*, der neben *Pediococcus halophilus* für die Sojasaucenherstellung eingesetzt wird, weist eine besonders hohe Alaninracemaseaktivität auf, welche für die Racemisierung von Ala während der Fermentation verantwortlich ist [12].

Für ein Vorkommen von D-AS in Hefen gibt es bislang nur wenige Befunde. BHATTACHARYYA und BANERJEE [25] gelang durch Bestimmung mit D-Aminosäureoxidase der Nachweis von D-AS im Zellpool von verschiedenen Hefenarten. LANGER [198] fand in einer Untersuchung von Ethanolextrakten verschiedener Hefeinkulturen signifikante Mengen an D-Asp, D-Glu, D-Ala und D-Arg. Weiterhin wur-

de beschrieben, daß aufgrund des Ausschlusses der Kontamination der Kulturen mit Bakterien die nachgewiesenen D-AS durch die Hefen selbst gebildet worden sein müssen. Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß verschiedene Hefen in Nährmedien mit D-AS als einziger Stickstoffquelle wachsen können, was Enzymsysteme zum Metabolismus der D-AS voraussetzt. Ein weiterer Nachweis für eine Bildung von D-AS durch Hefen gelang GOBBETTI [197] Er fand D-Ala und D-Glu in Weizenteigen, die mit *Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Saccharomyces exiguus* angeimpft worden waren. Obwohl die Art der Bildung von D-AS durch Hefen und ihre Bedeutung noch nicht geklärt sind, besteht aufgrund der beschriebenen Befunde kein Zweifel, daß Hefen in der Lage sind D-AS in signifikanten Mengen zu bilden.

Die Verwendung von Hefen in einer Mischkultur mit Bakterien bietet hier eine Erklärungsgrundlage für das Vorkommen von hohen Mengen an D-AS. Bei einigen komplexen, durch Hefen und Bakterien bewirkten, Fermentationsverfahren liegt die Bedeutung der Beteiligung einer Milchsäuregärung nicht so sehr bei der direkten Beeinflussung des Endproduktes durch die Stoffwechselprodukte der Milchsäurebakterien, sondern bei der Regulation des pH-Wertes [134,136]. Das trifft beispielsweise auf die Herstellung von obergärigen Bieren z.B. Berliner Weiße und Lambic Bieren (belgische obergärige Biersorte), denen eine Mischkultur von Hefen u.a. *Saccharomyces cerevisiae* und Milchsäurebakterien u.a. *Lactobacillus delbrückii*, zugesetzt wird.

HAUSCH [37] und ERBE et al. [199] fanden besonders in diesen Biersorten einen sehr hohen relativen Anteil von D-Asp (1,6 - 61,4 %), D-Ala (2,5 - 17,8 %) und D-Glu (4,9 - 47,3 %). Außerdem zeichnete sich die sehr heterogene Gruppe der obergärigen Biere durch ein breiteres D-AS-Spektrum im Vergleich zu den untergärigen Bieren aus.

In Sauerteigbrot, das üblicherweise mit Hilfe einer komplex zusammengesetzten Mischflora aus Hefen und Milchsäurebakterien hergestellt wird, fanden sich wie im nur mit Milchsäurebakterien fermentierten Getreide hohe Mengen an D-Ala (17,6 %) und D-Glu (5,2 %) [198]. Diese Gehalte an D-AS stiegen im Vergleich zu den Gehalten des Rohstoffes (Weizenkörner), welcher D-Ala (2,4 %), D-Asp (1,1 %) und D-Glu (1,4 %) enthielt, durch Fermentation mit einer Mischkultur erheblich an. Auffallend war der Anstieg des relativen Gehalts von D-Ala in fermentierten Weizenkörnern (4,4 %) und in Sauerteigbrot (17,6 %).

Die sich bei den fermentierten Sojasaucen ergebenden Abweichungen können einerseits in einer im Vergleich zu den Produkten differierenden Stoffwechsellage der verwendeten Mischkultur begründet sein. Zum anderen zeichnen sich Sojasaucen durch eine langfristige Fermentation und Reifung (3 bis 12 Monate) nach Zugabe der Mischkultur aus. Für die Herstellung der Sojasaucen werden u.a. Hefen wie z.B. *Saccharomyces* spp. (z.B. *Saccharomyces rouxii*) eingesetzt [133,136].

5.2.1.2.2 Gemischte Sojasaucen

In der vorliegenden Analyse wurden D-Asp (7,6 - 32,9 %), D-Ala (1,5 - 20,8 %) und D-Glu (4,0 - 16,6 %) in relativ hohen Mengen bei allen gemischten Sojasaucen gefunden (siehe Kap. 4.2.2.2). Dies deckt sich mit den Angaben in der Literatur [37,198], die Analysenergebnisse von gemischten Sojasaucen, welche aus Sojabohnen und Weizen hergestellt wurden, präsentiert. In diesen Untersuchungen wurde ebenfalls D-Asp (1,1 - 16,0 %) als Major-AS festgestellt. Zusätzlich wurden D-Ala, D-Glu, D-Arg, D-Tyr, D-Val und D-Phe gefunden, wobei die stark variierenden D-AS Gehalte auffielen.

Das Vorkommen der hohen Gehalte von D-AS ist in erster Linie auf das Vorhandensein der D-AS in den verwendeten Rohstoffen (Sojabohnen und Weizen) zurückzuführen. HAUSCH [37] fand bereits in einer Untersuchung von unfermentierten Weizenkörnern die D-Enantiomere von Asp, Glu und Ala. Dabei wurde festgestellt, daß D-Asp mengenmäßig mit 0,98 mg/100 g überwog und D-Ala mit 2,4 % den höchsten relativen Anteil zeigte.

Ein weiterer Grund für das Auftreten der D-AS ist eine chemisch induzierte Racemisierung der freien und proteingebundenen L-AS [32-38]. Gemischte Sojasaucen werden durch Verschnitt von fermentierten und säurehydrolysierten Sauen hergestellt. Dabei beträgt der Anteil der fermentierten Sauen bis zu 50 %. Die Säurehydrolysate werden aus Proteinen pflanzlicher Herkunft (meistens Sojabohnen oder Weizen) mit 20 % HCl aufgeschlossen und anschließend zur Neutralisierung mit Lauge behandelt. Während dieses Verfahrens besteht die Möglichkeit der Racemisierung der in Sojabohnen vorhandenen freien und proteingebundenen L-AS. Das Ausmaß sollte dabei, neben der AS-Struktur, im wesentlichen von Zeit, Temperatur,

pH-Wert und Ionenstärke abhängen [32-35]. Als besonders racemisierungsempfindlich hat sich proteingebundene Asp erwiesen.

In einer Untersuchung von ERBE und BRÜCKNER [176] wurde festgestellt, daß die Racemisierung der freien L-AS abhängig von pH-Wert war und die höchste chemisch induzierte Racemisierungsrate bei einem pH-Wert zwischen 2,5 und 3,0 lag. Besonders L-Asp wies nach 360 stündiger Behandlung mit 5 % Essigsäure (v/v) bei 100 ° C mit einer Racemisierungsrate von 49,6 % den höchsten Wert auf. Im Gegensatz dazu wurde nur 7,8 % D-Asp nach 96 stündiger Behandlung mit 6 M HCl bei 100 ° C festgestellt.

Um die Racemisierungsmaße der AS in Sojabohnen zu bestimmen, wurden in der vorliegenden Arbeit Sojabohnen nach einer industriellen Rezeptur hydrolysiert (siehe Kap. 4.2.2.2). Dafür wurden Sojabohnen mit 20 %iger HCl bei einer Temperatur von 100 ° C 72 Stunden hydrolysiert. Es wurden 9 L-AS in unterschiedlichem Maße in die entsprechenden D-Enantiomere umgewandelt. D-Asp wurde dabei mit 7,6 % als racemisierungsempfindlichste AS festgestellt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von ERBE und BRÜCKNER [176].

HAUSCH [37] fand bei GC-Untersuchungen von Hydrolysatwurzeln ein ähnliches Spektrum an D-AS wie bei den hier analysierten Sojabohnen. Auch bei den Wurzeln fiel der hohe relative D-AS Gehalt auf. Hydrolysatwurzeln werden aus Proteinen pflanzlicher und tierischer Herkunft durch Säureaufschluß und nachfolgende Neutralisation mit Lauge gewonnen. Die Produkte wiesen folglich einen hohen Gehalt an freien AS auf. Die D-AS entstehen im Zuge der säurekatalysierten Racemisierung. HAUSCH [37] gelang durch Säureaufschluß von Sojaweiß gewonnenen Würzsauces die Detektion von D-Asp als racemisierungsanfälligste AS mit höchsten Relativgehalten. Daraus läßt sich schließen, daß D-AS in gemischten Sojasaucen sowohl durch chemisch induzierte Racemisierung der AS als auch durch Zugabe von fermentierten Sojasaucen entstehen.

In allen untersuchten Sojasaucenproben wurden erhebliche Mengen an D-AS (siehe Kap. 4.2.2) gefunden, wobei die stark variierenden D-AS Gehalte der einzelnen Proben auffielen. D-Ala war jedoch Major-D-AS in allen fermentierten Sojasaucen, während D-Asp in gemischten Sojasaucen dominierte. Aufgrund des unterschiedlichen Vorkommens von beiden D-AS wird im folgenden durch Berechnung des relativen Mengenverhältnisses diskutiert, ob D-Ala und D-Asp als Marker zur Qualitäts- und

Authentizitätskontrolle für fermentierte und gemischte Sojasaucen in Frage kommen. In Abbildung 5-2 wird das Verhältnis zwischen den Anteilen an D-Ala und D-Asp in beiden Sojasaucengruppen dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, wiesen alle fermentierten Sojasaucen einen höheren Anteil von D-Ala im Vergleich zu dem Anteil von D-Asp auf, wobei der D-Ala-Anteil mit steigender Fermentationsdauer anstieg. Der Anteil von D-Ala lag bei 54,5 % in 3 Monaten fermentierten und bei 86,6 % in 6 Monaten fermentierten Sojasaucen. Die Dominanz von D-Ala in fermentierten Sojasaucen ist auf die Verwendung der Sojabohnenkoji als Rohstoff und eine lange Fermentation durch MO zurückzuführen. Aufgrund des Überwiegen des säurehydrolysierten Saucenanteils (zwischen 50 % bis 100 %) wiesen die gemischten Sojasaucen im Gegensatz zu fermentierten Sojasaucen einen hohen Anteil von D-Asp auf. Der D-Asp-Anteil stieg mit steigendem zugegebenen säurehydrolysierten Saucenanteil an, während der Anteil von D-Ala entsprechend abfiel. Damit könnte sich das Verhältnis zwischen den beiden D-AS zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle für Sojasaucen verwenden lassen.

Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschreiben, wurde die Bestimmung der Racemisierungsgrade der AS unter bestimmten Bedingungen zur Altersbestimmung u.a. in geologischen und archäologischen Proben vorgeschlagen. Häufiger diskutiert wurde auch eine mögliche Korrelation zwischen D-Aminosäuregehalt und dem Reifegrad von fermentierten Lebensmitteln, was für die Steuerung von Prozeßabläufen bei der industriellen, technologischen Herstellung von Lebensmitteln von Bedeutung sein könnte. DAS NEVES [200] nutzte die kontrollierten Herstellungs- und Lagerungsbedingungen bestimmter portugiesischer Weine zur Bestimmung einer zeitabhängigen, säurekatalysierten Isomerisierungsrate der freien AS und fanden dabei mit zunehmendem Alter bzw. fortschreitender Reifung der Weinen einen Anstieg der Gehalte an freien D-AS.

HAUSCH [37] und LANGER [198] beschrieben jedoch in einer unterschiedlich durchgeführten Untersuchung verschiedener Weine, daß ein Zusammenhang zwischen Lagerungsdauer und D-Aminosäuregehalt von Weinen nicht grundsätzlich gegeben sein muß, sondern möglicherweise eher einen Sonderfall darstellen könnte. Aufgrund des unterschiedlichen Vorkommens von D-Ala und D-Asp wird in dieser Arbeit anders als bisherige Versuche durch Berechnung des relativen Mengenver-

hältnisses diskutiert, ob die beide D-AS auf die Reifungsdauer für fermentierte Sojasaucen bzw. auf die Mischungsgrad für gemischte Sojasaucen zulässt. Wie die Abb. 5-2 zeigt, wiesen alle fermentierten Sojasaucen einen höheren Anteil von D-Ala im Vergleich zu dem Anteil von D-Asp auf, wobei der D-Ala-Anteil mit zunehmender Fermentationsdauer anstieg.

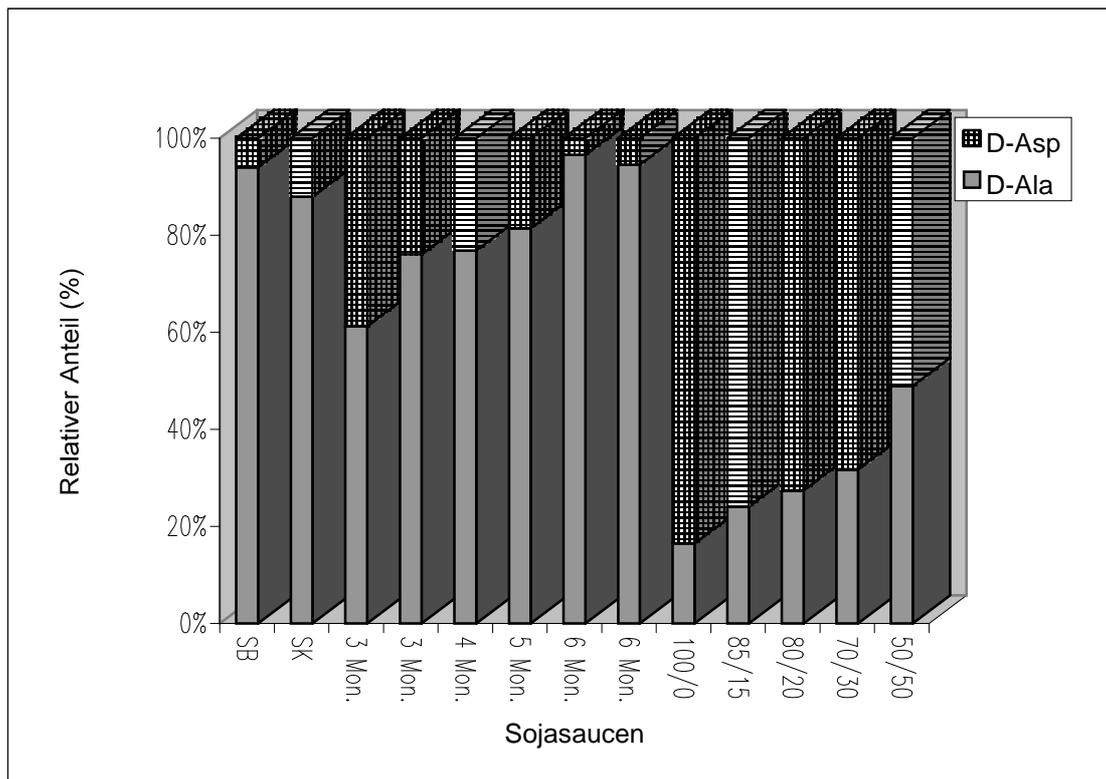


Abb. 5-2: Verhältnis zwischen D-Ala und D-Asp in fermentierten und gemischten Sojasaucen; SB Sojabohnen; SK Sojabohnenkochi; Zeit: Fermentationsdauer; x/y: Mischungsverhältnis zw. Säurehydrolysiertes und fermentierter Sojasaucen

Aufgrund des Überwiegen des säurehydrolysierten Saucenanteils wiesen die gemischten Sojasaucen im Gegensatz zu fermentierten Sojasaucen einen hohen Anteil von D-Asp auf. Der D-Asp-Anteil fiel mit steigendem zugegebenen fermentierten Saucenanteil ab, während der Anteil von D-Ala entsprechend anstieg. Somit erlaubt das Verhältnis zwischen den beiden D-AS auch eine präzise Aussage zur Schätzung der Reifungsdauer und Mischungsgrad für Sojasaucen.

5.2.1.3 Biogene Amine in Sojasaucen

Die Ergebnisse zeigen, daß in allen Sojasaucen die Gehalte an Him (2 – 124 mg/l), Put (2 – 461 mg/l) und Tym (2 – 568 mg/l) relativ hoch waren, wobei die fermentierten Sojasaucen im Vergleich zu den gemischten höhere Werte aufwiesen. Daneben waren im allgemeinen Pea, Oct, Cad, Spd und Spm in relativ niedrigen Mengen vorhanden.

Wie bereits in Kap. 1.2.1 erwähnt, entstehen BA in fermentierten Lebensmittel in Abhängigkeit vom Vorhandensein der L-Aminosäuren durch mikrobielle Decarboxylierung. Von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die hohen Gehalte an Him in fermentierten Sojasaucen ist *Pediococcus halophilus*, der ein Him-Bildungspotential besitzt. *Pediococcus halophilus* wird häufig zur industriellen Herstellung von Sojasaucen eingesetzt und wurde auch in natürlich fermentierten Sojasaucen nachgewiesen. Daneben entstehen auch Cad und Put, die besonders charakteristisch für mikrobiellen Verderb sind. Aufgrund des geringen BA-Gehaltes im Ausgangsmaterial, Sojabohnen (4 mg/kg) und Sojabohnenkoji (22 mg/kg), kann dessen Einwirkung zum hohen Gehalt von BA in Sojasaucen ausgeschlossen werden.

Him und Tym zeigten in fermentierten Sojasaucen im Fermentationsverlauf in ihren Gehalten eine steigende Tendenz. Gleichzeitig stieg auch der Gesamtgehalt an BA bei allen Proben an. Dies kann durch eine hohe Aktivität von *Pediococcus halophilus* (salztolerante Spezies) und zusätzlich durch die Aktivität bestimmter Milchsäurebakterien z.B. *Lactobacillus delbrueckii*, welche als Tym-Bildner bekannt sind, erklärt werden (siehe Kap. 1.2.2). Aufgrund der hohen Salzkonzentration (18 - 22 %) und des relativ niedrigen pH-Wertes (4,0 - 4,5) der Sojasaucen, kann das Wachstum von pathogenen Keimen ausgeschlossen werden. CHIN et al. [201] wiesen in zwei Sojasaucen hohe Him-Gehalte von 220 mg/l bzw. 2392 mg/l und Tym-Konzentrationen bis zu 466 mg/l. Auch Trm wurde in moderaten Mengen (bis 93 mg/l) detektiert, die jedoch in der vorliegenden Untersuchung nicht festgestellt werden. OKAMOTO et al. [202] konnten in Sojasaucen unterschiedlich hohe Mengen an Put, Spd, Him und Cad feststellen, hingegen Spm nur selten nachweisen.

In Falle der gemischten Sojasaucen waren die BA-Gesamtgehalte bei allen Proben niedriger als die der fermentierten Saucen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse in Gesamtmengen und Aminmuster ähnliche Werte wie in der Analyse von gemischten

Sojasaucen von MEIER [171] Die Ergebnisse zeigen ein breites Aminospektrum und neben hohen Konzentrationen an Him (9 - 649 mg/l) und Tym (8 - 647 mg/l) wurden Put, Spd und Spm detektiert. Cad, Ocp, Pea und Trm waren nur vereinzelt in gemischten Sojasaucen vorhanden.

Die reine Hydrolysatprobe [100/0] wies mit 10 mg/l einen geringen BA-Gesamtgehalt auf. Dies läßt den Schluß zu, daß der Anteil der diesen Gehalt übersteigt möglicherweise aus den zugemischten fermentierten Saucen stammt. Dieser Befund kann durch einen steigenden Gesamtgehalt an BA nach mit steigendem Anteil fermentierter Sojasauce bestätigt werden. Auffallend ist, daß der Gehalt der Polyamine Spd und Spm allgemein bei allen gemischten Proben höher ist als bei fermentierten Sojasaucen.

5.2.2 Miso

Die Produktionstechnologie für Misopasten ist bezüglich der verwendeten MO und Fermentationsverfahren sehr ähnlich wie die der fermentierten Sojasaucen (siehe Kap. 1.3.3). Je nach Einsatz bzw. Dominanz verschiedener Rohstoffe wird zwischen Weizen-, Gersten-, Reis- und Sojabohnen-Miso unterschieden. Die Vielfalt unterschiedlicher Qualitäten der Miso resultiert hauptsächlich aus der Variation der Rohstoffmischungen und der Reifungsdauer [133]. Da Miso im Gegensatz zur Sojasauce herstellung ausschließlich durch Fermentation gewonnen wird, spielen Rohstoffmischungen und Reifungsdauer als Qualitätskriterien eine wichtige Rolle. Die Reifungsdauer beträgt dabei mindestens 3 Monate, bei Miso mit höherer Qualität bis zu 1 Jahr.

5.2.2.1 Achirale Analytik der Aminosäuren in Miso

Aufgrund der Ähnlichkeit des Herstellungsverfahrens wiesen alle untersuchten Miso-proben ein den fermentierten Sojasaucen ähnliches AS-Muster auf. Die absoluten AS-Gehalte von Miso lagen ebenfalls in einem den Sojasaucen entsprechenden Bereich (21 - 79 g/kg). Allgemein wiesen in den absoluten Gehalten und in den relati-

ven Anteilen in allen untersuchten Miso Glu (14,2 - 20,6 %), Ala (5,5 - 11,7 %), Val (4,7 - 7,6 %), Leu (8,5 - 11,8 %) und Lys (7,4 - 9,7 %) die höchsten Werte auf, wobei v.a. der hohe Gehalt an Glu bei allen Proben wie bereits bei der Untersuchung von den Sojasaucen bemerkenswert war. Der absolute Gehalt lag zwischen 4,4 g/kg und 14,0 g/kg bzw. zwischen 14,2 % und 20,6 % des Gesamtgehalts.

In allen Misoproben wurden Orn und Cit als Arg-Abbauprodukte detektiert. Sojabohnenmiso der Serie A wiesen einen hohen Orn-Anteil am Gesamtgehalt auf, wobei der Arg-Anteil im Vergleich zum Rohstoff (Sojabohnen) erheblich herabgesetzt wurde. Da die beide AS im Rohstoff (Sojabohnen) nicht vorhanden waren, können die gefundenen Gehalte auf die Aktivität der MO während der Fermentation zurückgeführt werden. Cit und Orn sind Zwischenprodukte des Argininabbaus durch die Enzyme der MO und werden im Reifungsverlauf weiter zu Polyaminen wie Put, Spd und Spm umgewandelt.

Im folgenden wird anhand der nichtproteinogenen AS Orn und Cit über eine Perspektive zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle für Miso diskutiert. In Abbildung 5-3 wird das Verhältnis zwischen den Aminosäuren Arg, Cit und Orn dargestellt.

Die untersuchten Misoproben können aufgrund der unterschiedlichen Reifungsdauer und der Rohstoffmischung in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Sojabohnenmisoproben der Serie A können im Vergleich zu den Proben Serie B durch eine längere Reifung charakterisiert werden. In diesen Misoproben sind Arg, Cit und Orn enthalten, wobei alle Proben einen niedrigen Arg- und einen hohen Orn-Anteil aufwiesen. Da die Probe A1 und A4 noch Cit in geringen Mengen enthielten, läßt sich schließen, daß diese Misoproben noch weiter reifen könnten. Die Misoproben A2 und A3 wiesen nur Arg und Orn, jedoch kein Cit auf. Cit scheint während der Fermentation vollständig zu Orn und anderen Produkten abgebaut worden zu sein.

Im Gegensatz dazu können die Weizenmisoproben der Serie B durch eine kürzere Reifungsdauer charakterisiert werden. Daher zeigten diese Proben einen höheren Anteil von Arg im Vergleich zu dessen Abbauprodukten Cit (0,5 - 3,1 %) und Orn (0,7 - 3,8 %). Diese Annahme kann auch im Vergleich zu den Sojabohnenmisoproben der Serie A durch das Auftreten hoher Mengen von Polyaminen u.a. Put, Spd und Spm (siehe Kap. 4.2.2) bestätigt werden, die nach längerer Reifung abnehmen. Die Gehalte an Polyaminen Spd und Spm der Serie B waren erwartungsgemäß höher als bei den Proben der Serie A. Eine Ausnahme machte die Misoprobe B4, welche den höchsten relativen Orn-Anteil (3,8 %) von allen Proben der Serie B aufwies,

was auf eine lange Reifungsdauer hinweisen könnte. Aufgrund des ebenfalls hohen Cit-Anteils (3,1 %) kann jedoch auf eine nicht ausreichende Reifung geschlossen werden. Da Arg über Cit zu Orn umgewandelt wird, ist der Anteil von Cit und Orn umso höher, je intensiver die Aktivität der MO im Fermentationsverlauf wird.

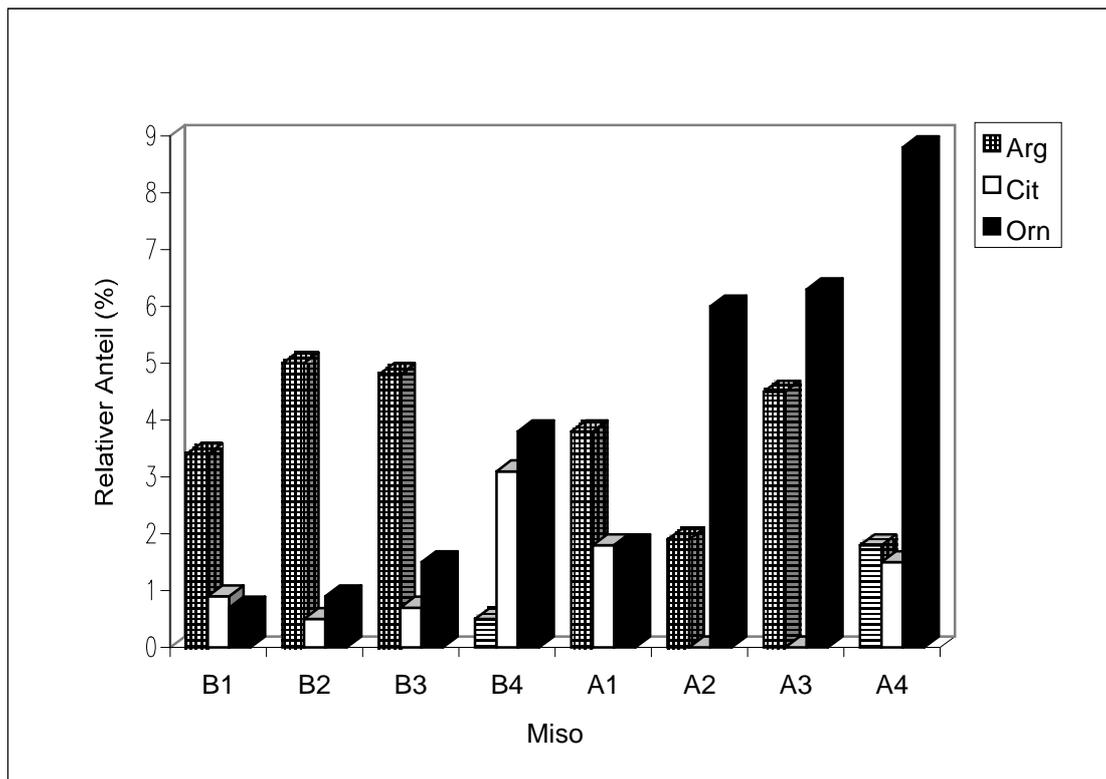


Abb. 5-3: Relativer Anteil von Arg, Cit und Orn am Gesamtgehalt in Miso; B1-B4 Weizenmiso, A1-A4 Sojabohnenmiso

Mit Ausnahme von Probe B4, welche die höchste Menge an Weizen (14,4 %) enthielt, zeigten alle Miso eine positive Korrelation zwischen Reifungsdauer und relativem Orn-Anteil (Abb. 5-3). Der Orn-Anteil stieg von 0,7 % bei 1 Monat fermentierter Miso B1 bis auf 8,8 % bei 6 Monate fermentierter Miso A4. Bei Misoprobe B4, welche einen hohen Anteil von Orn (3,8 %) und Cit (3,1 %) aufwies, handelt es sich vermutlich um eine länger als 3 Monate gereifte Miso. Es wird angenommen, daß der Orn-Anteil am AS-Gesamtgehalt eine Aussage zur Reifungsdauer von Miso zuläßt.

5.2.2.2 Chirale Analytik der Aminosäuren in Miso

In allen untersuchten Misoproben wurde D-Ala, D-Asp, D-Glu, D-Pro, D-Ser, D-Leu und D-Lys gefunden, wobei sich das Spektrum der D-AS nur wenig unterschied. Außerdem zeigten Miso entsprechend dem ähnlichen Herstellungsverfahren ein den fermentierten Sojasaucen vergleichbares D-AS-Muster. Die höchsten Relativgehalte wurden in allen Misoproben erwartungsgemäß bei D-Ala (21,0 - 26,0 %) beobachtet, während der niedrigste Gehalt mit 12,1 % bei einer unter Zusatz von Weizen (5 %) hergestellten Misoprobe (B1) festgestellt wurde. In dieser Probe war der Anteil an Sojabohnen (23,0 %) im Ausgangsmaterial am niedrigsten. Daraus resultierte, daß die D-Ala-Gehalte bei den Misoproben mit hohem Anteil von Sojabohnen höher waren.

Außerdem wurde D-Ser (0,7 - 9,3 %) in beiden Misogruppen detektiert. Da ein natives Vorkommen von D-Ser weder in Sojabohnen noch in Weizen bekannt ist, könnte das Auftreten dieser D-AS als ein Indikator für Miso aus Sojabohnenkoji dienen, da in Sojabohnenkoji bereits D-Ser (5,4 %) festgestellt wurde. Die Relativgehalte an D-Ser waren dementsprechend in Misoproben aus Sojabohnenkoji mit Ausnahme von Probe A3 höher als in Miso aus Weizen.

Aufgrund des Mangels an Studien zu D-AS in Miso war ein Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich. HAUSCH [37] fand in einer Untersuchung von Miso, die als Sojabohnen/Reis-Paste beschrieben war, kein D-Ala, sondern nur D-Asp (7,8 %), D-Glu (3,1 %) und D-Pro (2,0 %). Diese Mengen waren jedoch nicht in den vorliegenden Proben nicht auffindbar.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Herstellungsverfahren sind alle Ursachen des D-AS-Vorkommens in Miso grundsätzlich mit den von fermentierten Sojasaucen vergleichbar (siehe Kap. 5.1.2.2). Das Auftreten von D-Ala in Miso ist auf die Verwendung von Sojabohnen, Sojabohnenkoji sowie teilweise Weizen zur Herstellung zurückzuführen. Es wurde bereits festgestellt, daß D-Ala als Major-D-AS in Sojabohnen (7,8 %), Sojabohnenkoji (24,8 %) und Weizen (2,4) vorhanden war (vgl. Kap. 5.1.2).

Ein weiterer Grund für das Vorkommen von D-Ala liegt in der Verwendung von Bakterien wie *Streptococcus faecalis*, welche eine hohe Alaninracemaseaktivität aufweisen, und Hefen z.B. *Saccharomyces* spp.. Es wurde bereits diskutiert, daß die Ver-

wendung einer Mischkultur von Bakterien und Hefen eine zusätzliche Steigerung der mikrobiellen AS-Racemisierung zur Folge haben kann (vgl. Kap. 5.2.1.2.1).

5.2.2.3 Biogene Amine in Miso

Die Ergebnisse der BA-Analyse in Miso zeigten in Gesamtmengen und Aminmuster ähnliche Werte wie in der Analyse von Sojasaucen. Es ist zunächst zu vermuten, daß die beide fermentierte Sojaprodukte in Rohstoffen und Herstellungsprozess nahezu indentisch sind (vgl. Kap. 1.3.2 und 1.3.3). Auch hier waren hauptsächlich Him (6 - 321 mg/kg), Put (14 - 389 mg/kg) und Tym (17 - 417 mg/kg) enthalten. Besonders auffallend war, daß die Misoproben mit hohen Gehalten an Him bzw. Put stets hohe Mengen an Tym aufwiesen. Da diese BA in fermentierten Sojaprodukten durch Aktivität von *Pediococcus halophilus* und zusätzlich durch die Aktivität bestimmter Milchsäurebakterien entstehen, ist zu vermuten, daß bei diesem Fermentationsprozess keine Reinzuchtkulturen eingesetzt wurden. Die Misoproben der Serie A wiesen jedoch bedingt durch die längere Fermentationsdauer eine niedrigere Menge der Polyamine Spd und Spm im Vergleich zu den Proben der Serie B auf. In dieser Untersuchung konnte keine Korrelation zwischen den Gesamtgehalte an BA und Fermentationsdauer beobachtet werden.

Die Amingehalte von Miso sind in der Literatur bisher nur wenig beschrieben. SHALABY [112] geht von einer generellen Variation der Amingehalte in fermentierten Sojaprodukten je nach Ausgangsmaterial, Mikroflora sowie Fermentationsdauer aus. OKAMOTO et al. [202] wies in Miso hauptsächlich Put nach. Dagegen gaben MOWER et al. [116] einen Tym-Gehalt zwischen 450 und 563 mg/kg für eine fermentierte Paste aus gesalzenen, schwarzen Bohnen an.

5.2.3 Pepperonipasten

Die Herstellungsweise von Pepperonipasten ist bezüglich der verwendeten MO und Fermentationsverfahren deren der fermentierten Misopasten sehr ähnlich (siehe Kap. 1.3.3). Der Hauptunterschied zwischen Miso und fermentierten Pepperonipa-

sten liegt in der verwendeten Koji-Menge. Zum einen ist der Koji-Anteil in Pepperonipasten im Vergleich zu Miso weitaus niedriger, zum anderen werden Reis und Weizen zugesetzt. Die unterschiedlichen Qualitäten der Pepperonipasten resultieren hauptsächlich aus der Variation der Rohstoffmischungen, den Fermentationsbedingungen und der Reifungsdauer. Eine weitere Rolle spielt der Zusatz von Kochsalz, Gewürzen und anderer Ingredienzen (z.B. feingemahlenes Pepperonipulver). Als Merkmale zur Charakterisierung der unterschiedlichen Qualitäten dienen ähnlich wie bei Misopasten die verwendeten Rohstoffe und die Reifungsdauer. Die Reifungsdauer beträgt dabei mindestens 3 Monate, bei Pepperonipasten mit höherer Qualität bis zu 1 Jahr.

5.2.3.1 Achirale Analytik der Aminosäuren in Pepperonipasten

Aufgrund des ähnlichen Herstellungsverfahrens stellten alle untersuchten Pepperonipasten ein dem Miso ähnliches AS-Muster dar. Allgemein wiesen in allen untersuchten Pepperonipasten Glu (6,4 - 25,4 %), Pro (9,6 - 22,5 %), Arg (4,2 - 8,4 %), Asn (0,8 - 12,2 %) und Leu (2,8 - 8,3 %) in den relativen Anteilen die höchsten Werte auf. Besonders auffallend war der hohe Gehalt an Pro bei allen Proben. Der absolute Gehalt lag zwischen 2 g/kg und 4 g/kg bzw. zwischen 9,6 % und 22,5 % des Gesamtgehalt, wobei die Pepperonipasten aus Weizen einen höheren Anteil (11,2 - 22,5 %) als die aus Reis (9,6 - 12,8 %) aufwiesen. Da der Gehalt an Pro sowohl in Sojabohnen (0,03 g/kg bzw. 1,7 %) als auch in Sojabohnenkoji (0,07 g/kg bzw. 3,1 %) sehr niedrig war, kann das Vorkommen des hohen Gehalts von Pro auf die zusätzliche Verwendung von Reis und Weizen, welche eine hohe native Pro-Konzentration aufweisen, zurückgeführt werden.

Da Sojabohnenkoji bei der Herstellung fermentierter Sojaprodukte als Starterkultur verwendet wird, ist der Fermentationsverlauf abhängig von den eingesetzten Mengen an Sojabohnenkoji. Bei Pepperonipasten ist bedingt durch den Einsatz geringerer Mengen an Sojabohnenkoji bzw. hoher Mengen zugesetzten Getreides der Fermentationsverlauf im Vergleich zu Miso langsamer. Daraus resultiert ein niedrigerer Absolutgehalt an freien AS (14 - 33 g/kg).

Dieser Befund kann auch durch Betrachtung des Arg-Abbaus bestätigt werden. Orn und Cit entstehen als Arg-Abbauprodukte während mikrobieller Fermentation in beiden Pepperonipastengruppen in niedrigen Konzentrationen. Reispepperonipastenprobe B1 und B4 wiesen kein Orn, einen geringen Cit-Anteil (1,0 bzw. 0,4 %) und einen hohen Arg-Anteil (6,1 bzw. 8,4 %) auf. Probe B2 und B3 zeigten im Bezug auf den Arg-Anteil (5,0 bzw. 4,2 %) ein sehr niedrigen Orn-Anteil (0,6 bzw. 0,5 %). Die Reispepperonipasten der Serie A wiesen im Vergleich zu Weizenpepperonipasten der Serie B etwas höhere Orn- und Cit-Konzentrationen auf, welche auf eine längere Reifungsdauer zurückzuführen sind. Eine Ausnahme machte die Probe A3, die weder Orn noch Cit aufwies.

5.2.3.2 Chirale Analytik der Aminosäuren in Pepperonipasten

Alle im Rahmen dieser Untersuchung analysierten Pepperonipasten enthielten D-AS und ähnelten sich insofern im detektierten D-AS-Muster, als daß nahezu alle fermentierten Sojaprodukten die D-AS D-Ala, D-Asp und D-Glu aufwiesen. Insgesamt stellten alle Proben aufgrund ihres Herstellungsverfahrens ein dem Miso ähnliches D-AS-Muster dar. D-Ala war in Reis-Pepperonipasten, D-Asp in Weizen-Pepperonipasten dominierend. Dies kann auf die unterschiedliche Reifungsdauer zurückgeführt werden (siehe Kap. 2.4.4). Es wurde bereits in den vorangegangenen Untersuchungen von Sojasaucen und Miso festgestellt, daß in Sojaprodukten mit Sojabohnenkoji generell D-Ala im Reifungsverlauf einen hohen Relativgehalt aufwies. Die relativen Gehalte an D-Ala (1,6 - 12,7 %) mit Ausnahme von Probe A4 (30,6 %) waren in der Regel im Vergleich zu den anderen fermentierten Sojaprodukten niedriger. Dies erklärt sich wiederum durch einen verlangsamten Fermentationsverlauf bedingt durch geringe Mengen an Sojabohnenkoji.

Das Auftreten von D-Ala in Pepperonipasten ist auf die Verwendung von Sojabohnen, Sojabohnenkoji sowie teilweise Weizen zur Herstellung zurückzuführen. Es wurde bereits festgestellt, daß D-Ala als Major-AS in Sojabohnen (7,8 %), Sojabohnenkoji (24,8 %) und Weizen (2,4 %) vorhanden war (vgl. Kap. 5.1.2). Ein weiterer Grund für das Vorkommen von D-Ala liegt in der Verwendung von Bakterien z.B. *Streptococcus faecalis*, welche eine hohe Alaninracemaseaktivität aufweisen, und

Hefen *Saccharomyces* spp.. Es wurde bereits diskutiert, daß die Verwendung einer Mischkultur von Bakterien und Hefen eine zusätzliche Steigerung der mikrobiellen AS-Racemisierung zur Folge haben kann (vgl. Kap. 5.2.1.2.1).

Außerdem wurde zusätzlich D-Leu (0,8 - 3,6 %) in beiden Pepperonipastengruppen detektiert. Da das native Vorkommen von D-Leu weder in Sojabohnen noch in Weizen bekannt ist, kann das Auftreten dieser D-AS auf die Verwendung von Sojabohnenkaji als Starterkultur zurückgeführt werden. Darüberhinaus könnte D-Leu als eine Marker-AS zur Unterscheidung für Pepperonipasten aus Reis und Weizen dienen. In Sojabohnenkaji wurde bereits D-Leu (2,1 %) festgestellt. Die Relativgehalte an D-Leu war bedingt durch die längere Reifungsdauer in Reis-Pepperonipasten höher als in Pepperonipasten aus Weizen.

5.2.3.3 Biogene Amine in Pepperonipasten

Bedingt durch den verlangsamten Fermentationsverlauf sind die Pepperonipasten allgemein als aminarm einzustufen. Darüberhinaus konnte Cad, das bei längerer Fermentation bzw. Reifung eine Relevanz hat, nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Verwendung von Bakterien u.a. *Pediococcus halophilus* und *Lactobacillus delbrückii* wurden jedoch Him und Tym in unterschiedlichen Mengen gefunden. Spd und Spm kamen in allen Pepperonipasten mit Ausnahme von B1 und B2 vor, was auf die Bedeutung des Polyamins in der Sojabohnen hindeuten. In Sojabohnen konnten bereits nur Spd und Spm festgestellt werden. Die Probe A3 und B2 wiesen ähnlich wie die anderen fermentierten Sojaprodukten gleichzeitig hohe Gehalte an Him und Tym auf. In dieser Untersuchung konnte keine Korrelation zwischen den Gesamtgehalte an BA und Fermentationsdauer beobachtet werden.

5.2.4 Sake

5.2.4.1 Achirale Analytik der Aminosäuren in Sake

Die Absolutgehalte an AS der untersuchten Sakeproben lagen zwischen 516 mg/l und 3140 mg/l. Allgemein wiesen alle untersuchten Sakeproben niedrige Mengen an freien AS auf (HAUSCH [37] stellte 1960 mg/l in einer japanischen Sake fest), wobei die Proben A2 (2 Jahre alt) und A3 (5 Jahre alt) eine sehr ähnliche qualitative und quantitative AS-Zusammensetzung aufwiesen. Die Absolutgehalte an AS beider Proben lagen zwischen 3137 mg/l und 3140 mg/l. In beiden Proben waren die relativen Anteile von Arg (21,7 % bzw. 8,5 %) und Orn (3,7 % bzw. 4,7 %) am Gesamtgehalt hoch. Besonders zeigte die Sakeprobe A3 aufgrund der langen Fermentationsdauer einen niedrigeren Arg-Anteil sowie einen höheren Orn-Anteil im Vergleich zu der Probe A 2. Der Orn-Anteil am Gesamtgehalt wies eine steigende Tendenz (von 0,2 % bis 4,7 %) nach der Reifungsdauer bei allen Proben auf. Eine Ausnahme zeigte Sake A1 (2 Jahre alt), welche einen Absolutgehalt von 516 mg/l und besonders hohen Anteil von Asn (61,9 %) aufwies. In dieser Probe wurde eine niedrige Menge von Orn (1,2 mg/l) im Gegensatz zu den anderen Sakeproben (116 - 148 mg/l) festgestellt. Cit konnte in keiner Probe detektiert werden, was auf die Umwandlung von in Orn durch lange Fermentation hindeutet.

5.2.4.2 Chirale Analytik der Aminosäuren in Sake

In allen untersuchten Sakeproben wurden erheblichen Mengen an D-Asp, D-Glu, D-Asn, D-Ser, D-Ala und D-Pro gefunden, wobei sich das Spektrum der D-AS nur wenig unterschied (siehe Kap. 4.2.5). D-Leu (4,3 %) konnte nur in Probe A2 detektiert werden. Auffallend war die Detektion von D-Asn (7,0 - 33,6 %) bei allen Sakeproben. HAUSCH [37] konnte aber in einer Untersuchung von japanischer Sake mittels GC D-Asp (1,7 %), D-Glu (1,1 %) und D-Ala (0,6 %) feststellen.

Da ein natives Vorkommen von D-AS in Weizen nicht bekannt ist, kann das Auftreten von freien D-AS in Sake in erster Linie auf die Verwendung von Pilze und Hefen

zur Fermentation [133] zurückgeführt werden. Pilze werden im allgemein zur Herstellung von Weizenkoji eingesetzt, welches reich an Hydrolasen ist. Es wurde bereits beobachtet, daß D-Asp, D-Glu und D-Ala in hohen Mengen in Sojabohnenkoji vorhanden waren und die relativen Gehalte der D-AS durch Pilzfermentation erhöht wurden (vgl. Kap. 5.2.1). Die Verwendung von Hefen bietet auch eine Erklärungsgrundlage für das Vorkommen von hohen Mengen an D-AS (siehe Kap. 5.2.1.2.1).

5.2.4.3 Biogene Amine in Sake

Nach den Ergebnissen der BA-Analyse zeichnete sich die Sake durch ein sehr geringes Aminospektrum, so daß keine Korrelation zwischen den Gesamtgehalt an BA und Fermentationsdauer beobachtet werden können. Der Gesamtgehalt an BA lag zwischen 3 mg/l und 12 mg/l. Pea und Oct konnten in geringen Mengen bei allen Proben detektiert werden. Spd und Spm wurden dagegen nur in Probe A3, welche 5 Jahre gereift ist, gefunden.

5.2.5 Fischsaucen

5.2.5.1 Achirale Analytik der Aminosäuren in Fischsaucen

In untersuchten Fischsaucen wiesen Glu (12,9 - 17,6 %), His (5,8 - 12,3 %), Ala (7,3 - 10,5 %) und Lys (12,6 - 14,4 %) einen hohen relativen Anteil am Gesamtgehalt aufwiesen. Der Absolutgehalt an freien AS lag zwischen 72,6 g/kg und 155,3 g/kg Fischsaucen. Es wurden bei allen Proben bedingt durch die spontane Fermentation, d.h. ohne Zusatz von Starterkulturen, sowohl Cit (1,9 - 4,5 %) als auch Orn (1,8 - 4,4 %) in hohen Mengen detektiert, wobei Arg nur in den Fischsaucen A2 (0,3 %) und A4 (2,4 %) in geringen Mengen vorhanden war. Die Fischsauce A4 wies aufgrund der hohen Mengen an Fischextrakt (99,6 %) den höchsten Gesamt- (155 g/kg) und Glu-Gehalt (27 g/kg bzw. 17,6 %) von allen Proben auf.

5.2.5.2 Chirale Analytik der Aminosäuren in Fischsaucen

In allen untersuchten Fischsaucen konnten D-Asp, D-Glu, D-Ser, D-Ala und D-Pro detektiert werden. Dabei wurde festgestellt, daß D-Asp (3,8 - 19,8 %) und D-Pro (4,2 - 8,0 %) die Major-AS waren (siehe Kap. 4.2.6). D-Lys wurde lediglich in Fischsauce A4 gefunden, welche den höchsten Mengen an Fischextrakt sowie an D-Asp (19,8 %) und D-Ser (22,3 %) aufwies.

Da die Fischsaucen im allgemein durch spontane Fermentation (Dauer zw. 3 - 4 Monate) [133] hergestellt werden, kann das Vorkommen der D-AS in erster Linie auf die mikrobielle Aktivität zurückgeführt werden. Darüber hinaus legen die hohen Gehalte an D-Asp und D-Ser in Probe A4 die Vermutung einer unkontrollierte mikrobielle Kontamination während der Fermentation nahe.

5.2.5.3 Biogene Amine in Fischsaucen

Die Fischsaucen wiesen hohe Menge an BA auf, wobei besonders Trm (230 - 281 mg/kg), Oct (39 - 443 mg/kg) und Tym (82 - 373 mg/kg) bei allen Proben in erheblichen Mengen vorhanden waren. Die sehr hohen Gehalte an Trm, Oct und Tym deuten auf einen möglichen Verderb hin, da selbst bei der Verwendung von decarboxylasenreichen MO beim Fermentationsprozeß derart hohe Mengen schwer erreicht werden können (vgl. Kap. 4.3). Die erheblichen Konzentrationen an solchen BA, die mit längerer Lagerung bzw. Verderb entstehen [106,129,130,], lassen auf Eiweißzersetzungsprozesse schließen. Da die Fischextraktanteile der untersuchten Proben zwischen 78,0 % und 99,6 % liegen, könnte dies bedeuten, daß bei vorausgegangener Fermentation und möglicher Eiweißzersetzung viele Amine gebildet wurden konnten. In dieser Untersuchung zeigte sowohl der Gesamtgehalt als auch der Gehalt an Einzelaminen eine steigende Tendenz je nach der eingesetzten Menge an Fischextrakt.

5.2.6 Diskussion der Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HPLC-Systeme für die chirale AS-Analyse nach Derivatisierung mit OPA und *N*-Isobutyryl-L/D-cystein (IBL/DC). System I: HP 1090 (Hewlett Packard) und System II: LaChrom (Merck Hitachi). Die OPA/IBL(D)C-Methode wurde zuerst mit dem HP 1090 System optimiert und durch Modifizierung einzelner chromatographischer Parameter auf das LaChrom System übertragen. Dabei wurden die verwendeten Reagenzien und Puffer (siehe Kap. 2.3.2) in Mengen und Konzentrationen möglichst geringfügig verändert, so daß die Gesamttrennung und die Elutionsfolge nahezu identisch waren (siehe Kap. 3.3.1 und 3.3.2).

Im Folgenden werden Unterschiede der beiden Systeme im Bezug auf Gesamttrennung, Problematik einzelner AS-Trennungen, Derivatisierungsvorgang und Bestimmungsgrenzen dargestellt.

5.2.6.1 Gesamttrennung

Die von BRÜCKNER et al. [165,166] entwickelte OPA/IBL(D)C-Methode ermöglicht die Trennung aller proteinogenen L-Aminosäuren und der entsprechenden D-Enantiomere (17 DL-AS Paare), Glycin, Gaba, DL-Cit, DL-Orn sowie des internen Standards L-Abu mit Ausnahme von Prolin und Cyst(e)in mittels System HP 1090 an einer konventioneller RP-18-Phase (Hypersil ODS2) unter Verwendung eines einfachen linearen Gradienten innerhalb von 75 min in einem chromatographischen Lauf. Der Wechsel von IBLC auf IBDC führt dabei zu einer Elutionsumkehr innerhalb der Enantiomerenpaare, bei Derivatisierung mit IBLC eluieren zuerst die L-AS, bei IBDC die D-AS. Die Reihenfolge der AS untereinander bleibt jedoch unverändert, was vorteilhaft für die Identifizierung und Absicherung der Zuordnung der detektierten Signale ist.

Die Gesamttrennung und die Elutionsfolge der AS waren beim LaChrom System und beim HP 1090 System nahezu identisch, wobei einige Überschneidungen bzw. Koelutionen einzelner AS beobachtet wurden (siehe Kap. 5.2.6.2). Eine Trennsäule von Waters (Nova-Pak C₁₈, 300 mm x 3,9 mm I.D., Korngröße: 5 µm) wurde zur

besseren Trennung mit einer höheren Bodenzahl verwendet. Die Trennungen wurden mit einem binären linearen Gradienten bei einer Flußrate von 1 ml/min und einer Säulentemperatur von 25 °C durchgeführt. FITZNAR et al. [203] etablierten die OPA/IBL(D)C-Methode auf der Grundlage der Publikation von BRÜCKNER et al. [168,169] bei einem LaChrom (Merck, Hitachi) HPLC System. Dabei gelang ihnen die Trennung von 39 AS mit IBLC bzw. 40 AS mit IBDC innerhalb einer Gesamtretentionszeit von 80 min mittels eines tertiären Gradientensystems an einer konventionellen RP18-Phase (Superspher RP18, 125 mm x 4 mm I.D. Partikelgröße: 4 µm). Als einziger Unterschied in der Gesamttrennung bei beiden LaChrom Systeme wiesen frühere Elutionen von DL-Asp auf.

5.2.6.2 Problematik bei der Trennung einzelner D/L-AS

Erscheinung von D- bzw. L-Asp als Doppelpeak

Sowohl D- als auch L-Asp erschienen bei älteren Trennsäulen und bei niedrigerem pH-Wert als der von Reaktionspuffer (Kaliumborat-puffer pH 10,4) als Doppelpeak. Es handelt sich dabei möglicherweise um eine dissoziierte und eine undissoziierte Form des D- bzw. L-Asp-Derivats. Für die Stabilisierung des pH-Wertes und um einen optimalen Reaktionsverlauf zu gewährleisten wird eine pH-Neutralisierung mit HCl nach der Derivatisierung erforderlich.

Überschneidungen einzelner Aminosäuren

Je nach Leistung der Trennsäule wurden beim HP 1090 System einige Überschneidungen einzelner AS beobachtet, die bei BRÜCKNER et al. [165,166] nicht auftraten. Unter Verwendung IBLC D-Gln/L-Thr und D-Arg/D-Ala, unter Verwendung von IBDC L-Gln/D-Thr und L-Arg/L-Ala. Die Überschneidungen der Peaks hängen mehr oder weniger von der Leistung der Trennsäule ab, so daß sie meist durch den Einsatz einer neuen Trennsäule behoben werden konnten.

Beim LaChrom System wurden aufgrund ähnlicher Polaritäten von AS-Derivaten die Überschneidungen bei Gly/L-His/D-Thr/L-Cit/D-His und L-Arg/L-Ala unter Verwendung von IBLC sowie Gly/D-His/L-Thr/D-Cit/L-His und D-Arg/D-Ala unter Verwendung von IBDC beobachtet.

Bei der Identifizierung und Auswertung der Peaks konnten Fehler einerseits durch eine entsprechend angepaßte Integration minimiert werden. Zum anderen kehrt sich die Elutionsfolge der gebildeten Isoindolderivate bei Ersatz von IBLC durch IBDC um. Dadurch läßt sich in der Regel das Überschneidungsproblem lösen. Lediglich die Bestimmung von Gly war bei LaChrom System nicht möglich.

Koelutionen einzelner Aminosäuren;

Beim HP System 1090 traten Koelutionen einzelner Aminosäuren auf. D-His/L-Cit, L-Phe/L-Ile und D-Leu/D-Orn eluierten bei Verwendung von IBLC, die entsprechenden Enantiomeren der jeweiligen AS bei IBDC zusammen. Die Koelution von L-Phe und L-Ile war vom Leistungszustand der Trennsäule abhängig, die Trennung wurde durch Einsatz einer neuen Trennsäule verbessert.

Beim LaChrom System wurde die Koelution von L-Phe/L-Ile und D-Leu/D-Orn beobachtet.

Bei beiden Systemen konnte durch Einsatz von IBLC/IBDC-Reagenzien und eine entsprechend angepaßte Integration alle Peaks ausgewertet werden.

5.2.6.3 Derivatisierungsvorgang

Ein Vorteil des HP 1090 Systems sind die exakt definierten Derivatisierungsbedingungen, durch die die Instabilitäten von OPA-AS-Derivaten behoben werden können. Der programmierbare Autoinjektor des HP 1090 Gerätes ermöglicht in Verbindung mit dem Probengeber die vollautomatische und damit gut reproduzierbare Vorsäulenderivatisierung. Probe- und Reagenzlösungen werden dabei durch einen Spritzenkolben genau dosiert, in einer Kapilarschleife gemischt und nach Umsetzung zu den entsprechenden Isoindolderivaten injiziert.

Die Derivatisierung der AS bei LaChrom System erfolgte unter Verwendung eines programmierbaren Autosamplers. Dabei wurden Probe- und Reagenzlösungen in ein Reaktions-Vial überführt. Nach mehrmaligen Mischen und einer Reaktionszeit von 2 min wurden 20 µl des Aliquotes der Lösung injiziert. Trotz der verlängerten Gesamtderivatisierungsdauer wurden keine bemerkenswerten Veränderungen bzw. Beeinflussungen auf die Gesamttrennung der AS im Vergleich zum HP 1090 System be-

obachtet. Die erhöhten Injektionsmengen der AS-Derivate führen jedoch zur Reduzierung der Lebensdauer der Trennsäule.

5.2.6.4 Bestimmungsgrenzen

Die OPA/IBL(D)C-Derivate wurden bei beiden Systemen mittels FLD mit identischer Anregungs- (Ex. 230 nm) und Emissionswellenlänge (Em. 445) detektiert. Die Signalstärke des FLD 1046 A (HP 1090 System) ist durch die Einstellung des PMT Gain (7 bis 12) variierbar, was bei Verwendung von verschiedenen Standard- und Probenkonzentrationen vorteilhaft für die Erhöhung der Nachweisgrenze ist. In Rahmen dieser Arbeit wurde nach einigen Trennungen eines Standards PMT Gain 10 ausgewählt und dadurch eine Bestimmungsgrenze von 5,0 μM erreicht. Beim LaChrom System wurde aufgrund der hohen Empfindlichkeit des FLD (L-7480, eingestellt auf *low*) eine Bestimmungsgrenze von 0,5 μM erreicht.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Aminosäuren stellen die monomeren Bausteine der für lebende Organismen wichtigsten Stoffklassen, der Peptide und Proteine, dar. Besondere Bedeutung haben α -Aminosäuren, bei denen Amino- und Carboxylgruppe gemeinsam am C-2 gebunden sind. Beim Abbau von Proteinen werden regelmäßig 20 verschiedene α -AS gefunden, die dementsprechend als proteinogene AS bezeichnet werden. Proteinogene Aminosäuren (AS), mit Ausnahme des Glycins, besitzen zumindest ein Chiralitätszentrum, welches durch ein asymmetrisch substituiertes C-Atom gebildet wird, so daß zu jeder dieser AS ein zueinander spiegelbildlicher Enantiomer existiert.

Im Verlauf der Evolution hat sich in der Biosphäre eine starke Dominanz der Synthese und Verwendung von L-Aminosäuren (L-AS) gegenüber von D-Aminosäuren (D-AS) herausgebildet. Trotz der weitgehenden Etablierung stereoselektiver Prozesse in der belebten Natur zeigt sich innerhalb der proteinogenen AS eine beachtenswerte Verbreitung der D-AS. Die Entwicklung und Anwendung neuer Analysemethoden zur Trennung von D- und L-AS zeigt jedoch, daß D-AS im Menschen, in Tieren, Pflanzen, Mikroorganismen (MO) und Antibiotika, sowie in Lebensmitteln häufiger vorkommen als bislang angenommen wurde.

Von Bakterien ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß sie einen ausgeprägten D-AS-Stoffwechsel besitzen, der sie zur Biosynthese der D-AS aus den L-AS durch entsprechende Racemasen und Epimerasen befähigt. D-AS sind in fermentierten LM durch zur Herstellung eingesetzten MO weit verbreitet. Durch das Einwirken mikrobieller Enzyme werden L-AS teilweise in ihre optischen Antipoden umgewandelt. Zusätzlich werden durch Autolyse von Bakterien D-AS aus deren Peptidoglycan freigesetzt, so daß D-AS als mikrobielle Stoffwechselprodukte in diesen Lebensmitteln (LM) in relativ hohen Mengen auftreten. Viele protein- und aminosäurehaltige LM werden bei ihrer Herstellung, technologischen Bearbeitung oder Zubereitung einer Behandlung mit Säuren, Laugen und Hitze unterzogen, was zu einer mehr oder weniger starken Epimerisierung führt, die durch Gegenwart von Metallionen zusätzlich katalysiert werden kann.

Aus diesem Grunde wurde von BRÜCKNER et al. vorgeschlagen, daß D-AS als Indikatoren für die mikrobielle Fermentation und weiterhin zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle für fermentierten LM verwendet werden können.

Biogene Amine (BA), stickstoffhaltige, basische Verbindungen, entstehen im Stoffwechsel von Tieren, Pflanzen oder MO. Da ihre Bildung in LM größtenteils aus AS durch Aktivität der Decarboxylasen in MO erfolgt, sind besonders hohe Amingehalte in LM zu erwarten, bei deren Herstellung bzw. Verarbeitung oder Lagerung biochemische oder besonders mikrobiologische Eiweißveränderungen wie Fermentation oder Verderb stattfinden. Insbesondere in LM, die einer mikrobiellen Fermentation unterzogen wurden oder mikrobiell verdorben sind, können höhere Konzentrationen an BA gefunden werden. Aus diesem Grunde wird die Menge an Aminen zur Beurteilung der mikrobiellen Belastung von LM vorgeschlagen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Aminosäuren und biogene Amine in asiatisch fermentierten Lebensmitteln (engl. „Oriental or Asian Fermented Food“) exemplarisch anhand einer Gruppe fermentierter Sojaprodukte u. a. Sojasaucen, Miso und Peperonipasten, sowie Sake und Fischsaucen mittels HPLC und teilweise GC untersucht, um neue Perspektiven zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle für die untersuchten Lebensmitteln zu ermitteln.

Zur achiralen AS-Analyse wurde eine HPLC-Methode nach Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd/3-Mercaptopropionsäure (OPA/MPA) mit Kombination von 9-Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (FMOC-Cl) verwendet. Die Gesamtgehalte an freien AS in fermentierten Sojasaucen lagen zwischen 15 g/l und 57 g/l sowie zwischen 75 g/l und 396 g/l in gemischten Sojasaucen. Besonders auffällig war bei dieser Untersuchung die Detektion der nichtproteinogenen AS Cit und Orn, welche in Rohmaterialien (Sojabohnen) nicht vorhanden und durch Umwandlung von Arg während der Fermentation entstanden waren. Alle fermentierten Sojasaucen zeigten eine positive Korrelation zwischen der Reifungsdauer und dem relativen Anteil von Orn. Somit können diese beiden nichtproteinogenen AS als Indikatoren zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle für Sojasaucen verwendet werden.

Aufgrund der Ähnlichkeit des Herstellungsverfahrens wiesen alle untersuchten Miso- und Peperonipastenproben ein den fermentierten Sojasaucen ähnlichen AS-Muster auf. Orn wurde in allen, Cit in den meisten der untersuchten Misoproben detektiert. Sojabohnenmiso wiesen aufgrund der langen Reifungsdauer einen hohen Anteil von

Orn und Cit im Vergleich zu Weizenmiso auf. Bei dieser Untersuchung wurde festgestellt, daß das Verhältnis zwischen den Anteilen von Arg und Orn als ein Kriterium für die Bestimmung der Fermentationsdauer dienen könnten.

Zur Trennung und Bestimmung von freien D-AS wurde eine chirale HPLC-Methode nach Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd und *N*-Isobutyryl-L (bzw. D)-cystein (OPA/IBL(D)C) verwendet. Außerdem wurde die Anwendbarkeit der OPA/IBL(D)C-Methode für verschiedene HPLC-Apparaturen zur enantioselektiven Aminosäureanalytik am Beispiel von LaChrom - und HP 1090-System überprüft.

In allen untersuchten fermentierten Sojaprodukten wurden erhebliche Mengen an D-AS gefunden. Dabei wurde festgestellt, daß besonders D-Asp und D-Ala als Marker für Fermentation dienen könnten. In fermentierten Sojasaucen war D-Ala aufgrund der Aktivität der mikrobiellen Ala-Racemase dominierend. In gemischten Sojasaucen war D-Asp aufgrund der Säurehydrolysisierung der Rohmaterialien Major-D-AS. Im Falle der Misountersuchung konnte D-Ala für die Bestimmung der Fermentationsdauer festgestellt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Reifungsdauer war D-Ala in Reispepperonipasten sowie D-Asp in Weizenpepperonipasten dominierend. Sake und Fischsaucen wiesen eine hohe Gehalte an D-Asp, D-Glu, D-Ser, D-Pro und D-Ala auf.

Biogene Amine wurden als Ergänzung zur Qualitätskontrolle für fermentierte Lebensmittel unter Einsatz einer HPLC-Methode nach Vorsäulenderivatisierung mit *para*-Nitrobenzyloxycarbonylchlorid (PNZ-Cl) analysiert. Die Gesamtgehalte an BA lagen zwischen 79 mg/l und 1215 mg/l in Sojasaucen sowie zwischen 75 mg/kg und 1085 mg/kg in Miso. Pepperonipasten wiesen bedingt durch den verlangsamten Fermentationsverlauf einen niedrigen BA-Gehalt auf. In Sake konnten Pea und Oct in allen sowie Spd und Spm in einer Probe detektiert werden.

Die OPA/IBL(D)C-Methode ermöglicht die Trennung aller proteinogenen L-AS und der entsprechenden D-Enantiomere (17 DL-AS Paare), Glycin, Gaba, DL-Cit, DL-Orn sowie des internen Standards L-Abu mit Ausnahme von Prolin und Cyst(e)in mittels System HP 1090 an einer konventioneller RP-18-Phase (Hypersil ODS2) unter Verwendung eines einfachen linearen Gradienten innerhalb von 75 min in einem chromatographischen Lauf. Der Wechsel von IBLC auf IBDC führt dabei zu einer Elutionsumkehr innerhalb der Enantiomerenpaare, bei Derivatisierung mit IBLC

eluiert zuerst die L-AS, bei IBDC die D-AS. Die Reihenfolge der AS untereinander bleibt jedoch unverändert, was vorteilhaft für die Identifizierung und Absicherung der Zuordnung der detektierten Signale ist. Die Gesamttrennung und die Elutionsfolge der AS waren beim LaChrom System und beim HP 1090 System nahezu identisch, wobei einige Überschneidungen bzw. Koelutionen einzelner AS beobachtet wurden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. JAKUBKE HD, JESCHKEIT H (1982) Aminosäuren, Peptide, Proteine. Verlag Chemie, Weinheim
2. TESTA B (1983) Grundlagen der organischen Stereochemie. Verlag chemie, Weinheim
3. KÖPPEL (1984) Stereochemie. Diesterweg, Salle, Sauerländer, Frankfurt
4. HOLMSTEDT B, FRANK H, TESTA B (eds) (1990) Chirality and Biological Activity. Alan R. Liss. Inc. New York, USA
5. ROBINSON T (1976) D-amino acid in higher plants. *Life Sci.* **19**: 1097-1102
6. HOEPRICH PD (1965) Alanine: Cycloserine antagonism. VI. Demonstration of D-alanine in the serum of guinea pigs and mice. *J. Biol. Chem.* **240**: 1654-1660
7. NAGATA Y, AKINO T, OHNO K (1985) Microdetermination of serum D-amino acids. *Anal. Biochem.* **150**: 238-242
8. ARMSTRONG DW, DUNCAN JD, LEE SH (1991) Evaluation of D-amino acids levels in human urine and in commercial L-amino acid samples. *Amino Acids* **1**: 97-106
9. ENGEL MH, MACKO SA, SILFER JA (1990) Carbon isotope composition of individual amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* **348**: 47-49
10. MAN E, BADA JL (1987) Dietary D-Amino Acids. *Ann. Rev. Nutr.* **7**: 209-225
11. BADA JL (1972) Kinetics of racemization of amino acids as a function of pH. *J. Am. Chem. Soc.* **94**:1371-1373
12. ADAMS E (1972) Amino acid racemases and epimerases. The Enzymes. Vol. VI. BOYER PD (ed). Academic Press, New York: 479-507
13. MATSUSHIMA O, KATAJYMA H, YAMADA K, KANO Y (1984) Occurrence of free D-alanine and alanine racemase activity in bivalve molluscs with special reference to intracellular somoregulation. *Mar. Biol. Lett.* **5**: 217-225
14. FELBECK H, WILEY S (1987) Free D-amino acids in the tissues of marine bivalves. *Biol. Bull.* **173**: 252-259
15. D' ANIELO A, GIUDITTA A (1977) Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris* Lam. *J. Neurochem.* **29**: 1053-1057

16. OKUMA E, ABE H (1994) Simultaneous determination of D- and L-amino acids in the nervous tissues of crustaceans using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethylchloroformate and reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **660**: 243-250
17. CORRIGAN JJ, SRINIVASAN NG (1966) The occurrence of certain D-amino acids in insects. *Biochemistry* **5**: 1185-1190
18. BAYER E (1983) Chirale Erkennung von Naturstoffen an optisch aktiven Polysiloxanen. *Z. Naturforsch.* **38 B**: 1281-1291
19. BAYER E, PAULUS A (1987) Silanophilic Interactions in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **400**: 1-4
20. BAYER E, ALLMENDINGER H, ENDERLE G, KOPPENHOEFER B (1985) Anwendung von D-Chirasil-Val bei der gaschromatographischen Analytik von Enantiomeren. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **321**: 321-324
21. BAYER E, PAULUS A, PETERS B, LAUPP G, REINERS J, ALBERT K (1986) Conformational Behaviour of Alkyl Chains of Reversed Phases in High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **364**: 25-37
22. BAYER E, FRANK H, GERHARDT J, NICHOLSON G (1987) Capillary Gas Chromatographic Analysis of Amino Acids by Enantiomer labeling. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**: 234-240
23. SCHLEIFER KH, KANDLER O (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477
24. RAUNIO RP, MUNTER MJ, JAAKKOLA OJ, KARPPINEN JT (1978) D-amino acids of the amino acid pool and occurrence of racemase and D-amino acid oxidase activities in *Escheria coli*. *Folia Microbiol.* **23**: 341-348
25. BHATTACHARYYA SK, BANERJEE AB (1974) D-amino acids in the cell pool of bacteria. *Folia Microbiol.* **19**: 43-50
26. BRÜCKNER H, BECKER D, LÜPKE M (1993) Chirality of amino acids of microorganisms used in food biotechnology. *Chirality* **5**: 385-392
27. BRÜCKNER H, HAUSCH M (1993) Gas chromatographic characterization of free D-amino acids in the blood serum of patients with renal disorders and of healthy volunteers. *J. Chromatogr.* **614**: 7-17
28. DAVIES JS (1977) Occurrence and biosynthesis of D-amino acids. In: WEINSTEIN B (ed) *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*. Vol. 4, Dekker, New York: 1-27

-
29. BYCROFT BW (ed) (1988) Dictionary of antibiotics and related substances. Chapman and Hall, New York
 30. REINER R (1974) Antibiotika und ausgewählte Chemotherapeutika. Thieme, Stuttgart
 31. KLEINKAUF H, DÖHREN H (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *European J. Biochem.* **192**: 1-15
 32. FRANK H, WOIWODE W, NICHOLSON GJ, BAYER E (1981) Determination of the Rate of Acidic Catalyzed Racemization of Protein Amino Acids. *Liebigs Ann. Chem.:* 354-365
 33. LIARDON R, JOST R (1981) Racemization of free and protein-bound amino acids in strong mineral acid. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **18**: 500-505
 34. LIARDON R, LEDERMAN S (1986) Racemization kinetics of free and protein-bound amino acids under moderate alkaline treatment. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 557-565
 35. HAYASE F, KATO H, FUJIMAKI M (1973) Racemization of amino acid residues in proteins during roasting. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 191-192
 36. BADA EH, BADE JL (1985) Dietary D-amino acids. *Ann. Rev. Nutr.* **7**: 209-225
 37. HAUSCH M (1990) Chromatographische Bestimmung von Aminosäuren-enantiomeren in Lebensmitteln sowie in menschlichem Blutplasma. Dissertation, *Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim*
 38. BUNJAPAMAI S, MAHONEY RR, FAGERSON IS (1982) Determination of D-Amino Acids in Some Processed Foods and Effect of Racemization on *In Vitro* Digestibility of Casein. *J. Food Sci.* **47**: 1229-1234
 39. BRÜCKNER H, HAUSCH M (1989) Detection of free D-amino acids in food by chiral phase capillary gas chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* **12**: 680-684
 40. BRÜCKNER H, HAUSCH M (1990) D-Amino acids in dairy products: Detection, origin and nutritional aspects. Ripende cheeses. *Milchwiss.* **45**: 421-425
 41. BRÜCKNER H, HAUSCH M (1989) Gas Chromatographic Detection of D-Amino Acids as Common Constituents of Fermented Foods. *Chromatographia* **28**: 487-492
 42. BRÜCKNER H, HAUSCH M (1990) D-Amino acids as ubiquitous constituents in fermented foods. In: LUBEC G; ROSENTHAL GA. (eds) Amino Acids. Chemistry, Biology and Medicine. Escom, Leiden: 1172-1182

-
43. BRÜCKNER H, LÜPKE M (1991) Determination of amino acid enantiomers in orange juices by chiral phase capillary gas chromatography. *Chromatographia* **31**: 123-128
 44. HOFSSOMMER HJ, KLEIN I, GRÜNING J, HÖPKER HR (1989) Bestimmung von D-Aminosäuren in Fruchtsäften. *Flüssiges Obst* **56**: 646-651
 45. HOFSSOMMER HJ, KLEIN I, GRÜNING J, HÖPKER HR (1990) Bestimmung von D-Aminosäuren in Fruchtsäften in : "UltronChrom '89". 4. Würzburger Chromatographie Gespräche, 4.-6. Sept. 1989, HÖPDER HR (ed), 1. Auflage, Pharmacia LKB, Freiburg: 136-140
 46. GREENSTEIN JP, WINITZ M (1961) Chemistry of the Amino Acids. Vol. 1. John Wiley & Sons, New York, London
 47. SODA K (1968) Microdetermination of D-amino acid oxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal. Biochem.* **25**: 228-235
 48. GUILBAULT GG, LUBRANO GJ (1974) Amperometric enzyme electrodes. Part II: Amino acid oxidase. *Anal. Chim. Acta* **69**: 103-106
 49. YAO T, WASA T (1988) HPLC detection of L- and D-amino acids by use of immobilized enzyme electrodes as detectors. *Anal. Chim. Acta* **209**: 259-264
 50. DIXON M, KLEPPE K (1965) D-Amino Acid Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **96**: 357-367
 51. MANNING JM, MOORE S (1968) Determination of D- and L-Amino Acids by gas chromatography and mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20**: 710-714
 52. ZUMWALT RW, KUO KCT, GEHRKE CW (eds) (1987) Amino Acid Analysis by Gas Chromatography: Vol. I-III. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
 53. ALLENMARK SG (1988) Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications. Ellis Horwood Limited Publishers, John Wiley & sons, New York,Chicester,Brisbane,Toronto
 54. GIL-AV E, FEIBUSH B, CHARLES-SIGLER R (1966) Separation of Enantiomers by Gas Liquid Chromatography with an Optically Active Stationary Phase. *Tetrahedron. Lett.*: 1009-1015
 55. FRANK H, NICHOLSON GJ, BAYER E (1977) Rapid Gas Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers with a Novel Chiral Stationary Phase. *J. Chromatogr. Sci.* **15**: 174-176

-
56. SAEED T, SANDRA P, VERZELE M (1979) Synthesis and properties of a novel chiral stationary phase for the resolution of amino acid enantiomers. *J. Chromatogr.* **186**: 611-618
 57. KÖNIG WA (1987) The practice of enantiomer separation by capillary gas chromatography. Hüthig, Heidelberg
 58. PALLA G, DOSSENA A, MARCHELLI R (1985) Oligo-Oxaalkanoyl Tetraamides Derived from L-Phenylalanine as Stationary Phases in Capillary Gas Chromatographic Resolution of D,L-Amino Acids. *J. Chromatogr.* **349**: 9-15
 59. ABE I, MUSHA S (1980) Resolution of amino acid enantiomers by capillary gas chromatography on easily prepared optically active stationary phases. *J. Chromatogr.* **200**: 195-199
 60. FRANK H (1988) Chiral Stationary Phases for Capillary Gas Chromatography: Towards Higher Selectivity and Stability. *J. High Res. Chromatogr. Commun.* **11**: 787-792
 61. FRANK H (1990) Gas Chromatography of Enantiomers on Chiral Stationary Phases. In: HOLMSTEDT B; FRANK H; TESTA B (eds) Chirality and biological activity. Liss; New York: 33-54
 62. FRANK H, NICHOLSON GJ, BAYER E (1978) Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Optically Active Metabolites and Drugs on a Novel Chiral Stationary Phase. *J. Chromatogr.* **146**: 197-206
 63. FRANK H, NICHOLSON GJ, BAYER E (1978) Enantiomer labelling, a method for the quantitative analysis of amino acids. *J. Chromatogr.* **167**: 187-196
 64. FRANK H, EIMILLER A, KORNHUBER HH, BAYER E (1981) Gas Chromatographic Determination of Glutamine in the Presence of Glutamic Acid in Biological Fluids. *J. Chromatogr.* **224**: 177-183
 65. FRANK H, RETTENMEIER A, WELCKER H, NICHOLSON GJ, BAYER E (1982) Determination of Enantiomer-Labeled Amino Acids in Small Volumes of Blood by Gas Chromatography. *Anal. Chem.* **54**: 715-719
 66. DROZD J (1981) Chemical Derivatization in Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Lib.* 19, elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford
 67. SINGH AK, ASHRAF M (1988) Analysis of Amino Acids in Brain and Plasma Samples by Sensitive Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.* **425**: 245-255

-
68. FRANK H, VUJTOVIC-OCKENGA N, RETTENMEIER A (1983) Amino Acid Determination by Capillary Gas Chromatography on Chirasil-Val. Enantiomer Labelling and Nitrogen-Selective Detection. *J. Chromatogr.* **279**: 507-514
 69. GAMERITH G (1983) Gas-Liquid Chromatographic Determination of N(O,S)-Trifluoroacetyl n-Propyl Esters of Protein and Non-Protein Amino Acids. *J. Chromatogr.* **256**: 267-281
 70. SPACKMANN PH, MOORE S, STEIN WH (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acid. *Anal. Chem.* **30**: 1190-1198
 71. ROTH M (1971) Fluorescence Reaction for Amino Acids. *Anal. Chem.* **7**: 880-882
 72. COHEN SA, STRYDOM DJ (1988) Amino Acid Analysis Utilizing Phenylisothiocyanate Derivatives. *Anal. Biochem.* **174**: 1-16
 73. EINARSSON S, JOSEFSSON B, LAGERQUIST S (1983) Determination of amino acids with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr.* **282**: 609-618
 74. SIMMACO M, BIASE D, BARRA D, BOSSA F (1990) Automated amino acid analysis using precolumn derivatization with dansylchloride and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **504**: 129-138
 75. JANSEN EHJM, BER RH, BOTH-MIEDEMA R, DOORN L (1991) Advantages and limitations of pre-column derivatization of amino acids with dansyl chloride. *J. Chromatogr.* **553**: 123-133
 76. BEINERT WD, MEISNER A, FUCHS M, RIEDEL E, LÜPKE M, BRÜCKNER H (1992) OPA oder FMOC? Aminosäureanalyse mit dem Roboter-Autosampler AS-4000. *GIT Fachz. Lab.* **10**: 1018-1027
 77. ALLENMARK SG (1991) A useful reagent for derivatization of amino acids. *Tetrahedron Lett.* **31**: 1455-1458
 78. ENGELHARDT H, KÖNIG TH, KROMIDAS ST (1986) Optimization of enantiomeric separations with chiral bonded phases. *Chromatographia* **21**: 205-213
 79. DAVANKOV VA (1987) Separation of enantiomeric compounds using chiral HPLC systems. A brief review of general principles, advances, and development trends. *Chromatographia* **27**: 475-482
 80. KÖNIG WA (1976) Gaschromatographische Trennung von diastereomeren Aminosäureestern an chiralen stationären Phasen. *Chromatographia* **9**: 72-73

-
81. HARE PE, GEL-AV E (1979) Separation of D- and L-amino acids by liquid chromatography: Use of chiral eluents. *Science* **204**: 1226-1228
 82. GÜBITZ E, JUFFMANN E, JELLENZ W (1982) Direct separation of amino enantiomers by high performance ligand exchange chromatography on chemically bonded chiral phases. *Chromatographia* **16**: 103-106
 83. THELOHAN S, JADAUD P, WAINER IW (1989) Immobilized enzymes as chromatographic phases for HPLC: The chromatography of free and derivatized amino acids on immobilized trypsin. *Chromatographia* **28**: 551-555
 84. UDVARHELYI PM, SUNTER DC, WATKINS JC (1990) Direct separation of amino acid enantiomers using achiral crown ether stationary phase, application to 2-amino- ω -phosphonoalkanoic acids. *J. Chromatogr.* **519**: 69-74
 85. LI S, PURDY WC (1991) Liquid chromatographic separation of the enantiomers of dinitrophenyl amino acids using a β -cyclodextrin-bonded stationary phase. *J. Chromatogr.* **543**: 105-112
 86. ARMSTRONG DW, DUNCAN JD, LEE SH (1993) Evaluation of D-amino acid levels in human urine and in commercial L-amino acid samples. *Amino Acids* **1**: 97-106
 87. PIRKLE WH, HOUSE DW (1979) Chiral High-Pressure Liquid Chromatographic Stationary Phases. 1. Separation of the Enantiomers of Sulfoxides, Amines, Amino Acids, Alcohols, Hydroxy Acids, Lactones, and Mercaptans. *J. Org. Chem.* **44**: 1957-1960
 88. EINARSSON S, JOSEFSSON B, LAGERKVIST S (1983) Determination of amino acids with 9-fluorenylmethylchloroformate and RP-HPLC. *J. Chromatogr.* **282**: 609-618
 89. BRÜCKNER H, GAH C (1991) High-performance liquid chromatographic separation of DL-amino acids derivatized with chiral variants of Sanger's reagent. *J. Chromatogr.* **555**: 81-95
 90. BRÜCKNER H, KELLER-HOEHL C (1990) HPLC Separation of DL-Amino Acids Derivatized with N^2 -(5-Fluoro-2,4-Dinitrophenyl)-L-Amino Acid Amides. *Chromatographia* **31**: 123-128
 91. MARFEY P (1984) Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* **49**: 591-596

-
92. NIMURA N, TOYAMA A, KINOSHITA T (1984) Optical Resolution of Amino Acid Enantiomers by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **316**: 547-552
 93. KINOSHITA T, KASAHARA Y, NIMURA N (1981) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic resolution of non-esterified enantiomeric amino acids by derivatization with 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate. *J. Chromatogr.* **210**: 77-81
 94. GAL J, SEDMAN AJ (1984) R- α -Methylbenzyl isothiocyanate, a new and convenient chiral derivatizing agent for the separation of enantiomeric amino compounds by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **314**: 275-281
 95. DUNLOP DS, NEIDLE, A (1987) The separation of D/L-amino acid pairs by high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with optically active naphthylethyl isocyanate. *Anal. Biochem.* **165**: 38-44
 96. IWAKI K, YOCHIDA S, NUMURA N, KINOSHITA T (1987) Activated carbamate reagent as chiral derivatizing agent for liquid chromatographic optical resolution of enantiomeric amino compounds. *Chromatographia* **23**: 899-902
 97. NISHI H, ISHII K, TAKU K, SHIMIZU R, TSUMAGARI N (1989) New chiral derivatization reagent for the resolution of amino acids as diastereomers by TLC and HPLC. *Chromatographia* **27**: 301-305
 98. LANGGUTH P, SPAHN H, MERKLE HP (1990) Fluorescence assay for small peptides and amino acids: high-performance liquid chromatographic determination of selected substrates using activated S-fluroxapofen as a chiral derivatizing agent. *J. Chromatogr.* **528**: 55-64
 99. BRÜCKNER H, STRECKER B (1992) Chiral Monochloro-s-triazine as Derivatizing Reagents for Resolving DL-Amino Acids by HPLC. *Chromatographia* **33**: 586-587
 100. BRÜCKNER H, STRECKER B (1992) Use of chiral monohalo-s-triazine reagents for the liquid chromatographic resolution of DL-amino acids. *J. Chromatogr.* **627**: 97-105
 101. TAKAYA T, KISHIDE Y, SAKAKIBARA S (1981) Determination of the optical purity of amino acids by high-performance liquid chromatography. Modification of the Manning and Moore procedure. *J. Chromatogr.* **215**: 279-287

-
102. BRÜCKNER H, LÜPKE M (1995) Use of Urethane Protected α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides as Reagents for the Derivatization of DL-Amino Acids and their Liquid Chromatographic Separation as Diastereoisomers. *Chromatographia* **40**: 601-606
103. ASKAR A (1982) Biogene Amine in Lebensmitteln und ihre Bedeutung. *Ernähr. Umsch.* **29**: 143-148
104. ASKAR A, EL-SAIDY S, ALI A, SHEHATA MI, BASSIOUNY SS (1986) biogenic amines in fish products. *Dtsch. Lebensm. -Rundsch.* **82**: 188-191
105. ASKAR A, TREPTOW H (1986) Biogene Amine in Lebensmitteln. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
106. BEUTLING D (1996) Biogene Amine in der Ernährung. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
107. SILLA SANTOS MH (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Microbiol.* **29**: 213-231
108. PECHANEK U, BLEICHER G, PFANNHAUSER W, WOJDICH H (1980) Beitrag zur Untersuchung von biogenen Aminen in Käse und Fischen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **171**: 420-424
109. PECHANEK U, PFANNHAUSER W, WOJDICH H (1983) Untersuchung über den Gehalt biogener Amine in vier Gruppen von Lebensmitteln des österreichischen Marktes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**: 256-260
110. PFANNHAUSER W, PECHANEK U (1984) Biogenic amines in food: Formation, occurrence, analysis and toxicological evaluation. *Z. Gesamte Hyg. Grenzgeb.* **30**: 66-76
111. SHALABY AR (1993) Survey on biogenic amines in Egyptian foods: Sausage. *J. Sci. Food Agric.* **62**: 291-293
112. SHALABY AR (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **29**: 675-690
113. SHALABY AR, ABD-EL-RAHMAN HA (1995) Effect of potassium sorbate on development of biogenic amines during sausage fermentation. *Nahrung-Food* **39**: 308-315
114. ABDELAL AT (1979) Arginine Catabolism by Microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 139-168

-
115. CUNIN R, GLANSDORFF N, PIÉRARD A, STALON V (1986) Biosynthesis and Metabolism of Arginine in Bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**: 314-352
 116. MORET S, CONTE LS (1996) High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J. Chromatogr. A* **729**: 363-369
 117. KRÄMER J (1977) Lebensmittel-Mikrobiologie. 3. Neubearb. und erw. Auflage. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
 118. KARNOP K (1988) Fisch als Lebensmittel. Verderb von Salzsardellen durch Histaminbildende Pediokokken. *Fischwirtschaft* **35**: 28-31
 119. STRAUB B, KICHERER M, SCHILCHER SM (1995) The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**: 79-82
 120. EDWARDS ST, SANDINE WE (1981) Symposium: Microbial Metabolites of Importance in Dairy products. *J. Dairy Sci.* **64**: 2431-2438
 121. BEHLING AR, TAYLOR SL (1982) Bacterial Histamin Production as a Function of Temperature and Time of Incubation. *J. Food Sci.* **47**: 1311-1314
 122. FÄTH KP, RADLER F (1994) Investigation of the formation of amines by lactic acid bacteria. *Weinwiss.* **49**: 11-16
 123. GEORNARAS I, DYKES GA, HOLY AV (1995) Biogenic amine formation by poultry associated spoilage and pathogenic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 164-166
 124. MÜLLER G (1984) Grundlagen der Lebensmittelmikrobiologie. 5. Auflage, Steinkopff Verlag, Darmstadt
 125. STEFFEN C (1990) Kulturen als qualitätsbeeinflussender Faktor in der Käseherstellung. *GIT Fachz. Lab.* **34**: 751-757
 126. TARJÁN V, JÁNOSSY G (1978) The Role of Biogenic Amines in Foods. *Nahrung* **22**: 285-289
 127. SCHULZE K, ZIMMERMANN T (1982) Einfluß verschiedener Lagerungsbedingungen auf die Entwicklung biogener Amine in Thunfisch und Makrelenfleisch. *Fleischwirtschaft* **62**: 906-910
 128. SCHEUER R, RÖDEL W (1995) Bestimmung von biogenen Aminen in fermentierten Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* **75**: 73-75
 129. KARMAS E (1981) Biogenic Amines as Indicators of Seafood Freshness. *Lebensm. Wiss. Technol.* **14**: 273-275

-
130. VECIANA-NOGUÈS MT, MARINÉ-FONT A, VIDAL-CAROU MC (1997) Biogenic Amines as Hygienic Quality Indicators of Tuna. Relationships with Microbial Counts, ATP-Related Compounds, Volatile Amines, and Organoleptic Changes. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2036-2041
 131. HERÁNDEZ-JOVER T, IZQUIERDO-PULIDO M, VECIANA-NOGUÈS MT, MARINÉ-FONT A, VIDAL-CAROU MC (1997) Biogenic Amine and Polyamine Contents in Meat and Meat Products. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2098-2102
 132. SCHMITT RE, HAAS J, AMADÓ R (1988) Bestimmung von biogenen Aminen mit RP-HPLC zur Erfassung des mikrobiellen Verderbs von Schlachtgeflügel. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **187**: 121-124
 133. STEINKRAUS KH (1996) Handbook of Indigenous Fermented Foods. 2. Auflage, Verlag Marcel Dekker, Inc., New York, Basel
 134. KANDLER O (1991) Bedeutung der milchsäuren Gärung für die Herstellung von Sojaprodukten. In: Soja in Lebensmitteln, 2. Hamburger Soja-Tagung, Schriftenreihe aus dem Fachgebiet Getreidetechnologie, Berlin: 45-62
 135. KLAPPACH G (1991) Pilzlich fermentierte Lebensmittel. In: RUTLOFF (ed) Lebensmittelbiotechnologie-Entwicklung und Aspekte. Akademie-Verlag, Berlin: 122-125
 136. LUH BS (1994) Industrial production of soy sauce. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 467-471
 137. LING MY, CHOU CC (1996) Biochemical changes during the preparation of soy sauce koji with extruded and traditional raw material. *Int. J. Food Sci. Technol.* **31**: 511-517
 138. NUNOMURA N, SASAKI M (1986) Soy Sauce. In: REDDY NR, PIERSON MD, SALINKHE DK: Legume-Based Fermented Foods. CRS Press, Inc., Boca Raton, Florida: 6-46
 139. SUGIYAMA SI (1984) Selection of microorganisms for use in the fermentation of soy sauce. *Food Microbiol.* **1**: 339-347
 140. BEUCHAT LR (1984) Fermented Soybean Foods. *Food Technol.* **6**: 64-70
 141. HERRMANN K (1983) Über Sojabohnen und Sojaprodukte. *Ernähr. Umsch.* **30**: 175-179
 142. GOLBITZ P (1995) Traditional Soyfoods: Processing and Products. *J. Nutr.* **125 Suppl.**: S 570-S572

-
143. KOTTERER, MÜNCH (1985) Untersuchungsverfahren für die milchwissenschaftliche Laboratuim. 7. Auflage, Arbeitsgemeinschaft für das milchwissenschaftliche Fachbuch: 66-67
 144. CUNICO RL, SCHLABACH T (1983) Comparison of Ninhydrin and *o*-Phthalaldehyde Post-Column Detection Techniques for High-Performance Liquid Chromatography of Free Amino Acids. *J. Chromatogr.* **266**: 461-470
 145. GRASER TA, GODEL HG, ALBERS S, FÖLDI P, FÜRST P (1985) An Ultra Rapid and Sensitive High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Tissue and Plasma Free Amino Acids. *Anal. Biochem.* **151**: 142-152
 146. ALGERMISSEN B, NÜNDEL M, RIEDEL E (1989) Analytik von Aminosäuren mit Fluoreszenz-HPLC. *GIT Fachz. Lab.* **9**: 783-790
 147. DONG M, GANT R (1985) HPLC Analysis of amino acids by post column sodiumhypochloride *o*-phthalaldehyde reaction. *J. Chromatogr.* **327**: 17-25
 148. HUGHES GJ, WINTHERTALER KH, WILSON KJ (1979) Microsequence analysis: Peptide isolation using HPLC. *FEBS Lett.* **108**: 81-86
 149. BEINERT WD, MEISNER A, FUCHS M, REIDEL E, LÜPKE M, BRÜCKNER H (1992) OPA oder FMOC ? Aminosäureanalyse mit dem Roboter-Autosampler AS-4000. *GIT Fachz. Lab.* **10**: 1018-1027
 150. EUERBY MR (1988) Effect of differing thiols on the reversed-phase high-performance liquid chromatographic behaviour of *o*-phthaldialdehyde-thiol-amino acids. *J. Chromatogr.* **454**: 398-405
 151. PALMERINI CA, FINI C, FLORIDI A, MORELLI A, VEDOVELLI A (1985) HPLC analysis of free hydroxyproline and proline in blood plasma and of free and peptid bound hydroxyproline in urine. *J. Chromatogr.* **339**: 285-292
 152. SCHUSTER R (1988) Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **431**: 271-284
 153. GODEL H, SEITZ P, VERHOEF M (1992) Automated Amino Acid Analysis Using Combined OPA and FMOC-Cl Precolumn Derivatization. *LC-GC Intl.* **5**: 44-49
 154. GRTZFELD-HUESGEN A (1998) Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the HP 1100 Series HPLC. *Technical Note*

-
155. ASWARD DW (1984) Determination of D- and L-aspartate in amino acid mixtures by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of *o*-phthaldialdehyde. *Anal. Biochem.* **137**: 405-409
 156. HILL DW, WALTERS FH, WILSON TD, STUART JD (1979) High performance liquid chromatographic determination of amino acids in the picomole range. *Anal. Chem.* **51**: 1338-1341
 157. UMGAT H, KUCERA P, WEN LF (1982) Total amino acid analysis using pre-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.* **239**: 463-474
 158. JARRETT HW, COOKSY KD, ELLIS B, ANDERSON JM (1986) The separation of *o*-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on cotylsilica columns. *Anal. Biochem.* **153**: 189-198
 159. BUCK RH, KRUMMEN K (1984) Resolution of amino acid enantiomers by high performance liquid chromatography using automated precolumn derivatization with a chiral reagent. *J. Chromatogr.* **315**: 279-285
 160. BUCK RH, KRUMMEN K (1987) High-performance liquid chromatographic determination of enantiomeric amino acids and amino alcohols after derivatization with *o*-phthaldialdehyde and various chiral mercaptans. Application to peptide hydrolysates. *J. Chromatogr.* **387**: 255-265
 161. EINARSSON S, JOSEFSSON B, MÖLLER P, SANCHEZ D (1987) Separation of Amino Acid Enantiomers and Chiral Amines Using Precolumn Derivatization with (+)-1-(9-Fluorenyl)ethyl Chloroformate and Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **59**: 1191-1195
 162. JEGOROV A, TRISKA J, TRNKA T, CERNY M (1988) Separation of α -amino acid enantiomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography after derivatization with *o*-phthaldialdehyde and a sodium salt of 1-thio- β -D-glucose. *J. Chromatogr.* **434**: 417-422
 163. JEGOROV A, MATHA V, TRNKA T, CERNY M (1990) Enantiomeric separation of leucines. *J. High Resol. Chromatogr.* **13**: 718-720
 164. JEGOROV A, TRISKA J, TRNKA T (1994) 1-Thio- β -D-galactose as a chiral derivatization agent for the resolution of D,L-amino acid enantiomers. *J. Chromatogr.* **673**: 286-290

-
165. BRÜCKNER H, WITTNER R, HAUSCH M, GODEL H (1989) Chiral amino acid analysis in fermented foods using *o*-phthaldialdehyde and novel *N*-acyl-L-cysteines. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **333**: 775-776
 166. BRÜCKNER H, WITTNER R, GODEL H (1989) Automated enantioseparation of amino acids by derivatization with *o*-phthaldialdehyde and *N*-acylated cysteines. *J. Chromatogr.* **476**: 73-82
 167. BRÜCKNER H, HAASMANN S, LANGER M, WESTHAUSER R, WITTNER R (1994) Liquid chromatographic determination of D- and L-amino acids by derivatization with *o*-phthaldialdehyde and chiral thiols. *J. Chromatogr.* **666**: 259-273
 168. SPENGLER U, KIRSCHBAUM J, BAEK I-G, BRÜCKNER H (1999) HPLC-Bestimmung von Aminosäuren in fermentierten Lebensmitteln nach Derivatisierung mit OPA/FMOC-Cl. *Proc. Germ. Nutr. Soci.* **1**: 57
 169. UNGER KK, WEBER E (1995) Handbuch der HPLC Teil 1. 2. überarbeitete Auflage GIT Verlag GmbH, Darmstadt
 170. BRÜCKNER H, LÜPKE M (1995) Use of chromogenic and fluorescent oxycarbonyl chlorides as reagents for amino acids analysis by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **697**: 295-307
 171. MEIER A, KIRSCHBAUM J, BRÜCKNER H (1998) Flüssigchromatographische Methode zur Bestimmung von Biogenen Amine in Lebensmitteln mittels eines neuen Reagenzes. *Z. Ernährungswiss.* **37**: 110
 172. KIRSCHBAUM J, MEIER A, BRÜCKNER H (1999) Determination of Biogenic Amines in Fermented Beverages and Vinegars by Pre-column Derivatization with *para*-Nitrobenzyloxycarbonyl Chloride (PNZ-Cl) and Reversed-Phase LC. *Chromatographia.* **49**: 117-124
 173. SCHIEBER (1996) Bestimmung von Aminosäureenantiomeren in physiologischen Matrices mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. *Dissertation, Universität Hohenheim*
 174. SCHIEBER A, BRÜCKNER H, RUPP-CLASSEN M, SPECHT W, NOWITZKI-GRIMM S, CLASSEN HG (1997) Evaluation of D-amino acid levels in rat by gas chromatography - selected ion monitoring mass spectrometry: no evidence for subacute toxicity of orally fed D-proline and D-aspartic acid. *J. Chromatogr. B* **691**: 1-12

-
175. ERBE T, BRÜCKNER H (1997) Use of Chiral Amino Acid Analysis for Quality and Authenticity Control of Vinegar. In: AMADO R; BATTAGLIA R (eds) *Proceedings of Euro Food Chem IX, Sept. 24-26 1997, Interlaken, Switzerland*: 137-142
176. ERBE T, BRÜCKNER H (1998) Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography - selected ion monitoring mass spectrometry. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **207**: 400-409
177. ENGELHARDT H, ROHRSCHEIDER L (1998) Deutsche chromatographische Grundbegriffe zur IUPAC-Nomenklatur. Gemäß der IUPAC-Empfehlung „Nomenclature for Chromatography“ (1993). *Pure and Applied Chemistry* **65**: 819-872. Arbeitskreis Chromatographie der Fachgruppe Analytische Chemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.)
178. VAUGHAN IC, TERENCE DT (1982) Arginine Metabolism in Lactic Streptococci. *J. Bacteriol.* **150**: 1024-1032
179. STALON V, MERCENIER A (1984) L-Arginine Utilization by *Pseudomonas* Species. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 69-76
180. POOLMAN B, ARNOLD J, DRIESSEN M, KONINGS WN (1987) Regulation of Arginine-Ornithine Exchange and the Arginine Deiminase Pathway in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **169**: 5597-5604
181. LIU SQ, PRITCHARD GG, HARDMAN MJ, PILONE GJ (1996) Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway? *J. Appl. Bacteriol.* **81**:486-492
182. NIVEN GW, KNIGHT DJ, MULHOLLAND F (1998) Changes in the concentrations of free amino acids in milk during growth of *Lactococcus lactis* indicate biphasic nitrogen metabolism. *J. Dairy Res.* **65**: 101-107
183. ROBINSON T (1976) D-Amino acids in higher plants. *Life Sci.* **19**: 1097-1102
184. FRAHN JL, ILLMAN RJ (1975) The occurrence of D-alanine and D-alanyl-D-alanine in *Phalaris tuberosa*. *Phytochem.* **14**:1464-1465
185. ZENK MH, SCHERF H (1964) Verbreitung der D-Tryptophan-Konjugations-Mechanismen im Pflanzenreich. *Planta* **62**: 350-364
186. REKOSLAVSKAYA NI, GAMBURG KZ (1984) Possible role of *N*-malonyl-D-tryptophan as a source of auxin in plants. *Sov. Plant Physiol.* **31**: 481-487
187. REKOSLAVSKAYA NI, MARKOVA TA, GAMBURG KZ (1988) Appearance of *N*-malonyl-D-tryptophan in excised leaves during wilting. 1. The content of

- tryptophan and *N*-malonyl-D-tryptophan as affected by water deficit. *J. Plant Physiol.* **132**: 86-89
188. OGAWA T, FUKUDA M, SASAOKA K (1973a) Occurrence of *N*-malonyl-D-alanine in pea seedling. *Biochim. Biophys. Acta* **297**: 60-69
189. OGAWA T, FUKUDA M, SASAOKA K (1973b) Occurrence of D-amino acid and aminotransferase in pea seedlings. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **52**: 998-1002
190. OGAWA T, KOMOTO M, SASAOKA K (1977) Identification of D-aspartic acid and D-glutamic acid in pea seedlings. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1811-1812
191. OGAWA T, KAWASAKI Y, SASAOKA K (1978) De novo synthesis of D-alanine in germination *Pisum sativum* seedlings. *Phytochem.* **17**: 1275-1276
192. DURHAM JI, MORGAN PW, PRESCOTT JM, LYMAN CM (1973) An aminotransferase specific for the D-enantiomorph of methionine. *Phytochem.* **12**: 2123-2126
193. ALDAG RW, YOUNG JL (1970) Aspects of D-leucin and D-lysin metabolism in maize and ryegrass seedlings. *Planta* **95**: 187-201
194. MIURA GA, MILLS SE (1971) The conversion of D-tryptophan to L-tryptophan in cell cultures of tobacco. *Plant Physiol.* **47**: 483-487
195. BRÜCKNER H, WESTHAUSER T (1994) Chromatographic Determination of D-Amino Acids as Native Constituents of Vegetables and Fruits. *Chromatographia* **39**: 419-426
196. BRÜCKNER H, BECKER D, LÜPKE M (1993) Chirality of amino acids of microorganisms used in food biotechnology. *Chirality* **5**: 385-392
197. GOBBETTI M, SIMONETTI M, ROSSI J, COSSIGNANI L, CORSETTI A, DAMIANI P (1994) Free D- and L-amino acid evolution during sourdough fermentation and baking. *J. Food. Sci.* **59**: 881-884
198. LANGER M (1992) Trennung proteinogener und nichtproteinogener Aminosäuren mittels Gaschromatographie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. *Dissertation, Universität Hohenheim*
199. ERBE T, THUMMES K, KNOCHENHAUER J, GROSS P, BRÜCKNER H (1999) Enantioselektive Aminosäurenanalyse in Bieren und Bierrohstoffen mittels GC und HPLC. *Lebensmittelchemie* (im Druck)
200. CHAVES DAS NEVES HJ, VASCONCELOS AMP, COSTA ML (1990) Racemization of Wine Free Amino Acids as Function of Bottling Age. In: FRANK H,

-
- HOLMSTED B, TESTA B (ed) Chirality and Biological Activity. Alan R. Liss, Inc., New York: 137-143
201. CHIN KW, GARRIGA MM, METCALFE DD (1989) The Histamine Content of Oriental Foods. *Food Chem. Toxicol.* **27**: 283-287
202. OKAMOTO A, SUGI E, KOIZUMI Y, YANAGIDA F, UDAKA S (1997) Polyamine Content of Ordinary Foodstuffs and Various Fermented Foods. *Biosci. Biotechn. Biochem.* **61**:1582-1584
203. FITZNAR HP, LOBBES JM, KATTNER G (1999) Determination of enantiomeric amino acids with high-performance liquid chromatography and pre-column derivatisation with *o*-phthaldialdehyde and *N*-isobutyrylcysteine in seawater and fossil samples (mollusks). *J. Chromatogr. A* **832**: 123-132

8 ANHANG

Autosamplerprogramme

Die Autosamplerprogramme (Tab. 8-1 und 8-2) führen die Schritte der Derivatisierung der Aminosäuren und die Injektion des Reaktionsgemisches auf die Säule für OPA/MPA-FMOC-CI- und OPA/IBL(D)C-Methode durch.

Notwendige Ausstattung des L-7250;

0,5 ml Injektionsnadel (Standard), Reaktionrack, Waschlösung (MeOH:H₂O= 1:1, v/v)

Tab. 8-1: Einzelschritte des Autosamplerprogramms zur Derivatisierung der Aminosäuren mit Kurzbeschreibung der ausgeführten Schritte für OPA/MPA-FMOC-CI-Methode

Schritt	Befehl	Prozeß	Bemerkung
1	HOME	Anfang	
2	TIMER 0	Zeitschaltuhren auf 0 zurücksetzen	
3	OUT 1 2	Output-Signal auf den Anfangspunkt zurücksetzen	
4	WASH	Injektionsdurchlaß und Nadel waschen	
5	DO 30 1 1 1	Startsignal für max. 30 Derivatisierungen	Wiederholungsbefehl
6	WAIT SIGNAL 3 1	warten bis das System startbereit ist	Startbefehl
7	WASH	Injektionsdurchlaß und Nadel waschen	
8	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
9	ASP 1 15 3	15 µl Luft aufziehen	
10	TUBE 3 1 1	Vial mit Probe ansteuern	
11	ASP 1 45 3	45 µl aufziehen	Pipettieren der Probe
12	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
13	ASP 1 5 3	5 µl Luft aufziehen	
14	TUBE 0 0	Nadel von außen waschen	
15	TUBE 4 1 1	Reakti-Vials ansteuern	
16	DISP 1 45 4	5 µl Luft + 40 µl Flüssigkeit ausstoßen	

17	TUBE 0 0	Durchlaß waschen	Nadel innen u. außen waschen
18	DISP 1 1000 5	1000 µl Waschlösung abgeben	
19	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	Pipettieren des Borat- puffers
20	ASP 1 15 3	15 µl Luft aufziehen	
21	TUBE 2 1	Boratpuffer-Vial ansteuern	
22	ASP 1 220 3	220 µl Boratpuffer aufziehen	
23	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
24	ASP 1 5 3	5 µl Luft aufziehen	
25	TUBE 0 0	Nadel von außen waschen	
26	TUBE 4 I1	Reaktionsvials ansteuern	
27	DISP 1 205 3	200 µl Boratpuffer und 5 µl Luft ausstoßen	
28	TUBE 0 0	Durchlaß waschen	
29	DISP 1 1000 5	1000 µl Waschlösung abgeben	
30	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	Pipettieren des OPA-Reagen- zes
31	ASP 1 15 3	Aufziehen von 15 µl Luft	
32	TUBE 2 2	Ansteuern des OPA-Reagenz- Vials	
33	ASP 1 50 3	Aufziehen von 50 µl OPA- Reagenz	
34	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
35	ASP 1 5 3	Aufziehen von 5 µl Luft	
36	TUBE 0 0	Waschen der Nadel von außen	
37	TUBE 4 I1	Ansteuern des ReaktionsvVials	
38	DISP 1 45 3	Ausstoßen von 40 µl Flüssigkeit + 5 µl Luft	
39	TIMER 200	200 s warten	
40	TUBE 0 0	Durchlaß waschen	Nadel innen u. außen waschen
41	DISP 1 1000 5	1000 µl Waschlösung abgeben	
42	TUBE 4 I1	Ansteuern des Reaktionsvials	
43	DO 5 2 0 0	5 mal ausführen	Mischen
44	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
45	ASP 1 15 3	15 µl Luft aufziehen	
46	HEIGHT 41 2	Wert, der an jeden L-7250 indi- viduell angepaßt werden muß, wobei die Nadel nahezu auf den Boden des Vials reichen sollte	

47	ASP 1 200 4	Aufziehen von 200 µl der Reaktionsmischung	
48	WAIT 1.0		Mischen
49	DISP 1 200 4	Ausstoßen der 200 µl Reaktionsmischung	
50	LOOP	Schließt die Wiederholungsschleife des DO/LOOP-Befehls in Schritt 43	
51	TUBE 0 0	Nadel von außen waschen	Nadel innen u. außen waschen
52	DISP 1 1000 5	1000 µl Waschlösung abgeben	
53	WAITTIMER		Abwarten der Reaktionszeit
54	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
55	ASP 1 15 3	15 µl Luft aufziehen	Pipettieren des FMOC-Reagenzes
56	TUBE 2 3	Ansteuern des FMOC-Reagenz-Vials	
57	ASP 1 50 3	Aufziehen von 5 µl Luft	
58	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
59	ASP 1 5 3	Aufziehen von 5 µl Luft	
60	TUBE 0 0	Waschen der Nadel von außen	
61	TUBE 4 I1	Ansteuern des Reaktionsvials	
62	DISP 1 45 4	Ausstoßen von 5 µl Luft + 40 µl Flüssigkeit	
63	TUBE 0 0	Waschen der Nadel von außen	Nadel innen u. außen waschen
64	DISP 1 1000 5	1000 µl Waschlösung abgeben	
65	TUBE 4 I1	Ansteuern des Reaktionsvials	Mischen
66	DO 3 2 0 0	3 mal ausführen	
67	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
68	ASP 1 15 3	15 µl Luft aufziehen	
69	HEIGHT 41 2	Eintauchtiefe knapp über den Vialboden ansteuern	
70	ASP 1 200 3	Aufziehen von 200 µl der Reaktionsmischung	
71	WAIT 1.0		
72	DISP 1 200 4	Ausstoßen von 200 µl der Reaktionsmischung	
73	LOOP	schließt die Wiederholungsschleife des DO/LOOP-Befehls in Schritt 67	
74	TUBE 0 0		Nadel von außen waschen
75	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
76	ASP 1 10 3	Aufziehen von 10 µl Luft	

77	TUBE 2 4	Ansteuern des Essigsäure-Vials	
78	ASP 1 100 3	Aufziehen von 100 µl Säure	Pipettieren der Säure
79	WAIT 3.0		
80	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
81	ASP 1 5 3	Aufziehen von 5 µl Luft	
82	TUBE 4 I1	Ansteuern des Reaki-Vials	
83	DISP 1 105 3	Ausstoßen von 5 µl Luft + 100 µl Flüssigkeit	
84	DO 3 2 0 0	3 mal ausführen	Mischen
85	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
86	ASP 1 10 5	10 µl Luft aufziehen	
87	HEIGHT 41 2	Eintauchtiefe knapp über dem Vialboden ansteuern	
88	ASP 1 200 3	Aufziehen von 200 µl Reaktionsgemisch	
89	WAIT 3.0		
90	DISP 1 200 5	Ausstoßen der 200 µl Reaktionsgemisch	
91	WAIT 3.0		
92	LOOP	Schließt die Wiederholungsschleife des DO/LOOP-Befehls in Schritt 85	
93	WASH	Injektionsdurchlaß und Nadel waschen	
94	SNGLINJ 4 I1 20	Einspritzen von 20 µl	Injektion
95	TUBE 0 0	Nadel von außen waschen	
96	DISP 1 500 5	500 µl Waschlösung abgeben	
97	LOOP	Schließt die Wiederholungsschleife des DO/LOOP-Befehls in Schritt 5	Wiederholen der Derivatisierung
98	HOME	Ansteuern der Ausgangsposition	Home position

Tab. 8-2: Einzelschritte des Autosamplerprogramms zur Derivatisierung der Aminosäuren mit Kurzbeschreibung der ausgeführten Schritte für OPA/IBL(D)C-Methode bei LaChrom -System

Schritt	Befehl	Prozeß	Bemerkung
1	HOME	Anfang	
2	TIMER 0	Zeitschaltuhren auf 0 zurücksetzen	
3	OUT 1 0	Output-Signal auf den Anfangspunkt zurücksetzen	
4	WASH	Injektionsdurchlaß und Nadel waschen	
5	DO 30 1 1 1	Startsignal für max. 30 Derivatisierungen	Wiederholungsbefehl
6	WAIT SIGNAL 3 1	warten bis das System startbereit ist	Startbefehl
7	WASH	Injektionsdurchlaß und Nadel waschen	
8	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
9	ASP 1 15 3	15 µl Luft aufziehen	
10	TUBE 3 1 1	Vial mit Probe ansteuern	Pipettieren der Probe
11	ASP 1 100 3	100 µl aufziehen	
12	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
13	ASP 1 5 3	5 µl Luft aufziehen	
14	TUBE 0 0	Nadel von außen waschen	
15	TUBE 4 1 1	Reaktionsvial ansteuern	
16	DISP 1 105 3	5 µl Luft + 100 µl Flüssigkeit ausstoßen	
17	TUBE 0 0	Durchlaß waschen	
18	DISP 1 1000 5	1000 µl Waschlösung abgeben	
19	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
20	ASP 1 15 3	15 µl Luft aufziehen	
21	TUBE 2 1	Boratpuffer-Vial ansteuern	Pipettieren des Boratpuffers
22	ASP 1 450 3	450 µl Boratpuffer aufziehen	
23	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
24	ASP 1 5 3	5 µl Luft aufziehen	
25	TUBE 0 0	Nadel von außen waschen	
26	TUBE 4 1 1	Reaktionsvial ansteuern	
27	DISP 1 455 3	450 µl Boratpuffer und 5 µl Luft ausstoßen	
28	TUBE 0 0	Durchlaß waschen	Nadel innen u. außen waschen
29	DISP 1 1000 5	1000 µl Waschlösung abgeben	

30	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	Pipettieren des OPA-Reagenzes
31	ASP 1 15 3	Aufziehen von 15 µl Luft	
32	TUBE 2 2	Ansteuern des OPA-Reagenz-Vials	
33	ASP 1 80 3	Aufziehen von 80 µl OPA-Reagenz	
34	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
35	ASP 1 5 3	Aufziehen von 5 µl Luft	
36	TUBE 0 0	Waschen der Nadel von außen	
37	TUBE 4 I1	Ansteuern des Reakti-Vials	
38	DISP 1 85 3	Ausstoßen von 80 µl Flüssigkeit + 5 µl Luft	Nadel innen u. außen waschen
39	TUBE 0 0	Durchlaß waschen	
40	DISP 1 1000 3	1000 µl Waschlöpsung abgeben	Pipettieren des IBC-Reagenzes
41	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
42	ASP 1 15 3	15 µl Luft aufziehen	
43	TUBE 5 1	Ansteuern des IBC-Vials	
44	ASP 1 20 3	Aufziehen von 20 µl der IBC-Lösung	
45	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
46	ASP 1 5 3	5 µl Luft aufziehen	
47	TUBE 4 I1	ansteuern des Reakti-Vials	
48	DISP 1 25 4	Ausstoßen von 20 µl IBC-Lösung + 5 µl Luft	
49	WAIT 2.0		
50	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	Mischen
51	ASP 1 10 3	10 µl Luft aufziehen	
52	TIMER 120	120 s warten	
53	DO 3 2 0 0	3 mal ausführen	
54	TUBE 4 I1	Ansteuern des Reakti-Vials	
55	ASP 1 400 3	Aufziehen von 400 µl der Reaktionsmischung	
56	WAIT 1.0		
57	DISP 1 400 5	Ausstoßen von 5 µl Luft + 40 µl Flüssigkeit	
58	WAIT 2.0		
59	LOOP	Schließt die Wiederholungsschleife des DO/LOOP-Befehls in Schritt 53	
60	TUBE 0 0		

61	ASP 1 1000 5		
62	WAITTIMER		
63	HEIGHT 0 2	Nadelhöhe 0	
64	SINGLINJ 4 I1 250	Einspritzen von 250 µl	Injektion
65	TUBE 0 0	Nadel von außen waschen	
66	DISP 1 500 5	500 µl Waschlösung abgeben	
67	LOOP	schließt die Wiederholungsschleife des DO/LOOP-Befehls in Schritt 5	Wiederholen der Derivatisierung
68	HOME	Ansteuern der Ausgangsposition	home position

Kalibrierung

Tab. 8-3: Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß der Kalibrierungskurven ($y = \text{Peakflächen } [\mu\text{V}\cdot\text{s}]$, $x = \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$)

AS	Regressionsgeradenleichung	Bestimmtheitsmaß
Asp	$y = 197453,96x + 320200,29$	0,997
Glu	$y = 204199,56x + 272284,88$	0,997
Asn	$y = 228416,56x + 234264,50$	0,997
Ser	$y = 207677,52x + 391668,14$	0,997
Gln	$y = 233046,19x + 243450,96$	0,997
His	$y = 117362,92x + 123938,94$	0,997
Gly	$y = 86472,82x + 116543,92$	0,998
Thr	$y = 190430,00x + 226861,74$	0,997
Cit	$y = 236001,62x + 285734,43$	0,997
Arg	$y = 232155,81x + 274744,98$	0,997
Ala	$y = 187788,34x + 255199,39$	0,998
Tau	$y = 222340,04x + 237639,87$	0,998
Gaba	$y = 134646,90x + 136579,00$	0,997
Tyr	$y = 207277,61x + 242459,62$	0,997
Val	$y = 215095,36x + 199893,65$	0,999
Met	$y = 228378,10x + 81258,92$	0,994
Ile	$y = 218684,98x + 360316,18$	0,997
Trp	$y = 289715,89x + 277091,59$	0,997
Phe	$y = 226171,02x + 166654,61$	0,996

Leu	$y = 220281,32x + 155479,83$	0,996
Orn	$y = 28060,02x + 45915,67$	0,994
Lys	$y = 31770,75x + 127909,96$	0,992
Pro	$y = 1798019,00x + 57716,97$	0,997

Tab. 8-4: Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß der Kalibrierungskurven für OPA/IBLC bei HP 1090 System ($y = \text{Peakflächen } [\%F*s]$, $x = \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$)

AS	Regressionsgeradenleichung	Bestimmtheitsmaß
L-Asp	$y = 1,1169x - 1,2465$	0,998
D-Asp	$y = 1,0740x - 3,7486$	0,997
L-Glu	$y = 1,0825x - 1,6612$	0,999
D-Glu	$y = 1,1835x - 5,8489$	0,998
L-Asn	$y = 1,1037x + 1,4076$	0,999
D-Asn	$y = 1,0023x + 0,8852$	0,999
L-Ser	$y = 1,3002x + 0,2211$	0,999
D-Ser	$y = 1,0233x + 0,3365$	0,998
L-Gln	$y = 1,0014x - 1,0002$	0,997
D-Gln	$y = 1,1002x + 0,3336$	0,998
L-Thr	$y = 0,9987x + 0,2254$	0,999
D-Thr	-	-
Gly	$y = 1,3874x + 0,4478$	0,996
L-His	-	-
D-His	$y = 0,9958x - 1,3325$	0,999
L-Cit	$y = 1,0335x - 0,7785$	0,999
D-Cit	$y = 1,0036x + 1,2221$	0,999
L-Arg	$y = 0,9954x + 0,1147$	0,999
D-Arg	$y = 1,1257x + 0,6658$	0,999
L-Ala	$y = 1,0258x + 0,6887$	0,998
D-Ala	$y = 1,2554x - 0,8847$	0,999
Gaba	$y = 1,0024x - 2,3357$	0,999
L-Tyr	$y = 1,0584x + 0,5421$	0,998
D-Tyr	$y = 1,1258x - 1,0024$	0,998
L-Val	$y = 1,1466x + 0,5784$	0,999
D-Val	$y = 1,2451x - 0,6684$	0,999
L-Met	$y = 1,0365x - 0,8874$	0,999

D-Met	$y = 1,0369x - 0,8874$	0,999
L-Trp	$y = 1,1147x - 0,5874$	0,999
D-Trp	$y = 1,156x - 0,8854$	0,999
L-Phe	$y = 1,1472x + 0,3365$	0,999
D-Phe	$y = 1,5471x - 0,8874$	0,999
L-Ile	-	-
D-Ile	$y = 1,1654x - 1,8801$	0,999
L-Leu	$y = 1,2365x + 1,1142$	0,998
D-Leu	-	-
L-Orn	$y = 1,2365x + 0,7451$	0,999
D-Orn	-	-
L-Lys	$y = 1,2419x + 0,9954$	0,999
D-Lys	$y = 1,0025x - 1,1147$	0,999

- Aufgrund der Überschneidungen nicht bestimmbar

Tab. 8-5: Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß der Kalibrierungskurven für OPA/IBDC bei HP 1090 System ($y = \text{Peakflächen } [\%F*s]$, $x = \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$)

AS	Regressionsgeradenleichung	Bestimmtheitsmaß
L-Asp	$y = 1,0169x - 1,2465$	0,999
D-Asp	$y = 1,0340x - 1,7486$	0,997
L-Glu	$y = 1,0225x - 1,2612$	0,999
D-Glu	$y = 1,1135x - 5,8489$	0,998
L-Asn	$y = 1,0037x + 1,2076$	0,999
D-Asn	$y = 1,0033x + 0,9852$	0,999
L-Ser	$y = 1,0002x + 0,9211$	0,999
D-Ser	$y = 1,0133x + 0,7365$	0,998
L-Gln	$y = 1,1014x - 1,2002$	0,997
D-Gln	$y = 1,0332x + 0,7836$	0,998
L-Thr	-	-
D-Thr	$y = 0,9387x + 0,2254$	0,999
Gly	$y = 1,1874x + 0,7478$	0,996
L-His	$y = 1,22872x + 0,1258$	0,999
D-His	-	-
L-Cit	$y = 1,0315x - 0,8785$	0,999

D-Cit	$y = 1,1036x + 1,1221$	0,999
L-Arg	$y = 0,9854x + 0,2147$	0,999
D-Arg	$y = 1,2257x + 0,9658$	0,999
L-Ala	$y = 1,1258x + 0,6987$	0,998
D-Ala	$y = 1,1554x - 0,9847$	0,999
Gaba	$y = 1,1024x - 1,3357$	0,999
L-Tyr	$y = 1,1584x + 0,9421$	0,998
D-Tyr	$y = 1,2258x - 1,1024$	0,998
L-Val	$y = 1,2466x + 0,2384$	0,999
D-Val	$y = 1,0451x - 0,5684$	0,999
L-Met	$y = 1,1365x - 0,2874$	0,999
D-Met	$y = 1,3369x - 0,2874$	0,999
L-Trp	$y = 1,2147x - 0,4874$	0,999
D-Trp	$y = 1,056x - 0,0854$	0,999
L-Phe	$y = 1,0472x + 0,5365$	0,999
D-Phe	-	-
L-Ile	$y = 1,0654x - 1,1801$	0,999
D-Ile	-	-
L-Leu	-	-
D-Leu	$y = 1,15584x - 1,0021$	0,999
L-Orn	-	-
D-Orn	$y = 1,2365x + 0,7451$	0,999
L-Lys	$y = 1,0419x + 0,7954$	0,999
D-Lys	$y = 1,2025x - 1,0147$	0,999

- Aufgrund der Überschneidungen nicht bestimmbar

Tab. 8-6: Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß der Kalibrierungskurven für OPA/IBLC bei LaChrom Systeme, (y = Peakflächen [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$], x = Konzentration [μM])

AS	Regressionsgeradenleichung	Bestimmtheitsmaß
L-Asp	$y = 220281,32x + 155479,83$	0,996
D-Asp	$y = 28060,02x + 45915,67$	0,994
L-Glu	$y = 31770,75x + 127909,96$	0,992
D-Glu	$y = 236001,62x + 285734,43$	0,997
L-Asn	$y = 232155,81x + 274744,98$	0,997
D-Asn	$y = 187788,34x + 255199,39$	0,998

L-Ser	$y = 222340,04x + 237639,87$	0,998
D-Ser	$y = 218684,98x + 360316,18$	0,997
L-Gln	$y = 289715,89x + 277091,59$	0,997
D-Gln	$y = 226171,02x + 166654,61$	0,996
L-Thr	$y = 220281,32x + 155479,83$	0,996
D-Thr	-	-
Gly	-	-
L-His	-	-
D-His	$y = 207677,52x + 391668,14$	0,997
L-Cit	$y = 204199,56x + 272284,88$	0,997
D-Cit	$y = 228416,56x + 234264,50$	0,997
L-Arg	$y = 207677,52x + 391668,14$	0,997
D-Arg	$y = 233046,19x + 243450,96$	0,997
L-Ala	$y = 117362,92x + 123938,94$	0,997
D-Ala	$y = 86472,82x + 116543,92$	0,998
Gaba	$y = 190430,00x + 226861,74$	0,997
L-Tyr	$y = 236001,62x + 285734,43$	0,997
D-Tyr	$y = 232155,81x + 274744,98$	0,997
L-Val	$y = 187788,34x + 255199,39$	0,998
D-Val	$y = 222340,04x + 237639,87$	0,998
L-Met	$y = 134646,90x + 136579,00$	0,997
D-Met	$y = 207277,61x + 242459,62$	0,997
L-Trp	$y = 218684,98x + 360316,18$	0,997
D-Trp	$y = 289715,89x + 277091,59$	0,997
L-Phe	-	-
D-Phe	$y = 220281,32x + 155479,83$	0,996
L-Ile	-	-
D-Ile	$y = 228378,10x + 81258,92$	0,994
L-Leu	$y = 28060,02x + 45915,67$	0,994
D-Leu	-	-
L-Orn	$y = 236001,62x + 285734,43$	0,997
D-Orn	-	-
L-Lys	$y = 187788,34x + 255199,39$	0,998
D-Lys	$y = 222340,04x + 237639,87$	0,998

- Aufgrund der Überschneidungen nicht bestimmbar

Tab. 8-7: Gleichungen der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß der Kalibrierungskurven für OPA/IBDC bei LaChrom Systeme, (y = Peakflächen [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$], x = Konzentration [μM])

AS	Regressionsgeradenleichung	Bestimmtheitsmaß
L-Asp	$y = 232155,81x + 274744,98$	0,997
D-Asp	$y = 187788,34x + 255199,39$	0,998
L-Glu	$y = 222340,04x + 237639,87$	0,998
D-Glu	$y = 134646,90x + 136579,00$	0,997
L-Asn	$y = 232155,81x + 274744,98$	0,997
D-Asn	$y = 187788,34x + 255199,39$	0,998
L-Ser	$y = 222340,04x + 237639,87$	0,998
D-Ser	$y = 197453,96x + 320200,29$	0,9997
L-Gln	$y = 204199,56x + 272284,88$	0,997
D-Gln	$y = 228416,56x + 234264,50$	0,997
L-Thr	-	-
D-Thr	$y = 233046,19x + 243450,96$	0,997
Gly	-	-
L-His	$y = 86472,82x + 116543,92$	0,998
D-His	-	-
L-Cit	$y = 236001,62x + 285734,43$	0,997
D-Cit	$y = 232155,81x + 274744,98$	0,997
L-Arg	$y = 187788,34x + 255199,39$	0,998
D-Arg	$y = 222340,04x + 237639,87$	0,998
L-Ala	$y = 134646,90x + 136579,00$	0,997
D-Ala	$y = 207277,61x + 242459,62$	0,997
Gaba	$y = 215095,36x + 199893,65$	0,999
L-Tyr	$y = 228378,10x + 81258,92$	0,994
D-Tyr	$y = 218684,98x + 360316,18$	0,997
L-Val	$y = 289715,89x + 277091,59$	0,997
D-Val	$y = 226171,02x + 166654,61$	0,996
L-Met	$y = 220281,32x + 155479,83$	0,996
D-Met	$y = 28060,02x + 45915,67$	0,994
L-Trp	$y = 134646,90x + 136579,00$	0,997
D-Trp	$y = 207277,61x + 242459,62$	0,997
L-Phe	$y = 215095,36x + 199893,65$	0,999
D-Phe	-	-
L-Ile	$y = 31770,75x + 127909,96$	0,992
D-Ile	-	-

L-Leu	-	-
D-Leu	$y = 289715,89x + 277091,59$	0,997
L-Orn	-	-
D-Orn	$y = 220281,32x + 155479,83$	0,996
L-Lys	$y = 28060,02x + 45915,67$	0,994
D-Lys	$y = 31770,75x + 127909,96$	0,992

- Aufgrund der Überschneidungen nicht bestimmbar

Danke

Herrn Prof. Dr. Brückner danke ich für die Überlassung des Themas und die damit verbundene Möglichkeit, am Institut für Ernährungswissenschaft, Professur für Lebensmittelwissenschaften, eine Doktorarbeit durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Muskat danke ich für die Zweitkorrektur.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Jochen Kirschbaum für seine stets rat- und tatkräftige Unterstützung bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt ferner Herrn Dr. Klaus Moch für die aufmunternden Worte und seine Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Thorsten Erbe und Herrn Ralf Pätzold bedanke ich mich herzlich für ihre Freundschaft.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises gilt mein Dank für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Eltern, Schwiegereltern und meiner Familie für die anhaltende Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Baek
Vorname	In-Girl
Geburtsdatum	27. 09. 1963
Staatsangehörigkeit	koreanisch
Familienstand	verheiratet (2 Kinder)

Bildungsgang

1979-1982	Daeshin Gymnasium Seoul, Korea
1982-1986	Studium der Ernährungswissenschaft an der Univ. Inha Korea; Bachelor of Science
1988-1990	Studium der Lebensmitteltechnologie an der TU München
1991-1993	Wehrdienst in Seoul, Korea
1993-1997	Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaft an der Justus-Liebig-Univ. Gießen; Dipl. oec. troph.
seit Juli 1997	Doktorand am Institut für Ernährungswissenschaft, Professur der Lebensmittelwissenschaften an der Uni. Justus-Liebig-Univ. Gießen