ALP science 2007, Nr. 509

VORKOMMEN VON LYSINOALANIN IN MILCH UND MILCHPRODUKTEN

Technisch-wissenschaftliche Informationen

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches
Volkswirtschaftsdepartement EVD
Forschungsanstalt
Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

Inhalt

Zusammenfassung	3
LAL kann in proteinreichen Lebensmitteln vorkommen	4
Methoden für den Nachweis von LAL	4
Untersuchung von Milch und Milchprodukten	4
In flüssiger Milch tritt LAL bisweilen auf	5
LAL in Käse von Herstellung abhängig	6
LAL in Milchpulver und Proteinkonzentraten	7
Untersuchung der Proben auf den LAL-Gehalt an ALP	8
Folgerungen	8
Resumé / Summary	9
Literatur	10

ALP science

Titel
Vorkommen von Lysinoalanin in Milch und Milchprodukten

Erste Ausgabe

Autoren
Robert Sieber, Ueli Bütikofer, Nadine Kaldas, Brita Rehberger, ALP

Fotos
Helena Hemmi, ALP (Fotomontage Titelseite)
Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

Herausgeber
Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP
Schwarzenburgstrasse 161
CH-3003 Bern
Telefon +41 (0)31 323 84 18
Fax +41 (0)31 323 82 27
http: www.alp.admin.ch
e-mail: science@alp.admin.ch

Kontakt
Ueli Bütikofer, ALP
Telefon +41 (0)31 323 84 82
Fax +41 (0)31 323 82 27
e-mail: ueli.buetikofer@alp.admin.ch

Gestaltung
Helena Hemmi, ALP (Konzept, Layout)

Erscheinung
Mehrmals jährlich in unregelmässiger Folge

ISBN 978-3-905667-49-3
ISSN 1660-7856 (online)

Robert Sieber, Ueli Bütikofer, Nadine Kaldas und Brita Rehberger

VORKOMMEN VON LYSINOALANIN IN MILCH UND MILCHPRODUKTEN

Keywords: lysinoalanine, milk, dairy product, analytics

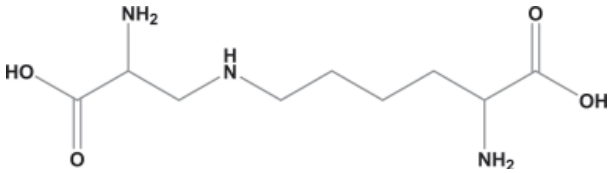


Abb. 1: Chemische Formel von Lysinoalanin

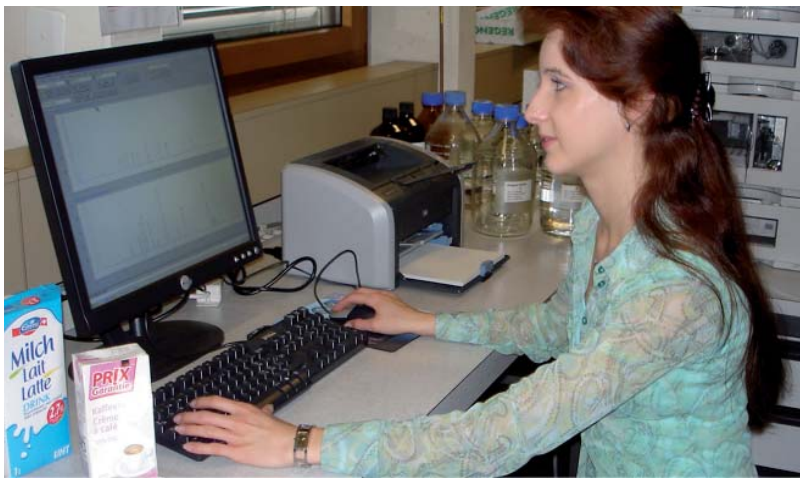
Zusammenfassung

Lysinoalanin (LAL) entsteht als unerwünschtes Folgeprodukt bei der alkalischen Behandlung von Proteinen oder bei der Erhitzung von proteinhaltigen Lebensmitteln. Durch das benachbarte Vorhandensein reagieren Dehydroalanin und Lysin über die ε-Aminogruppe des Lysins miteinander. Da die Bildung weitgehend irreversibel ist, wird die Verwertung des Lysin-Anteils ganz oder zum grossen Teil blockiert. Mit einer verbesserten Analysenmethode wurden Milch sowie diverse Milchprodukte aus dem Handel auf den LAL-Gehalt untersucht. Die aus dem Handel an ALP untersuchten UHT-Produkte (Milchdrink, Vollrahm, Kaffeerahm und Kondensmilch) enthielten in der Regel kein LAL, ein UHT-Kaffeerahm-Erzeugnis wies einen erhöhten LAL-Gehalt auf. Die Herstellung von Käse und Käseprodukten führte zu keiner nennenswerten LAL-Bildung. Die untersuchten Kaseinate enthielten zudem kein LAL, diverse Milchpulver sowie Kindernährmittel in Pulverform wiesen hingegen teilweise einen erhöhten LAL-Gehalt auf. Des Weiteren wiesen Milchpulver mit aufgeschlossenem Milchprotein bis zu 2296 mg LAL/kg Protein auf. In der Lebensmittelqualitätssicherung dient LAL als Erhitzungsindikator. Ist der Anteil an LAL in der Probe hoch, wurde die Milch oder das Milchprodukt offenbar bei der thermischen Behandlung entweder zu hohen Temperaturen ausgesetzt oder zu lange behandelt. Die grosse Schwankungsbreite im LAL-Gehalt bei Milch und Milchprodukten ist in erster Linie auf unterschiedliche Temperaturbelastungen und Erhitzungszeiten zurückzuführen.

Lysinoalanin (N$^{\varepsilon}$-(DL-2-Amino-2-carboxyethyl)-L-Lysin; abgekürzt als LAL, siehe Abb. 1) ist eine basische Aminosäure, die bei der alkalischen Behandlung von Proteinen – dabei werden bestimmte funktionelle Eigenschaften erzielt – oder bei der mässigen Erhitzung von Lebensmitteln bei neutralem pH-Wert entstehen kann (Bohak 1964; Sternberg *et al.* 1975). LAL ist kein Dipeptid, da diese Verbindung keine Peptidgruppe enthält und daraus nach der Hydrolyse nicht zwei Aminosäuren entstehen. LAL wie auch Histidinoalanin und weitere Crosslink-Aminosäuren zählen zu den Quervernetzungen (Cross-linking) eines Proteins.

Ausgangspunkt für die Bildung von LAL ist das benachbarte Auftreten von Dehydroalanin und Lysin. Diese beiden Substanzen reagieren über die ε-Aminogruppe des Lysins miteinander.

Anfangs der 70er Jahre fand LAL in der Lebensmittelwissenschaft zunehmend Beachtung, da bei Ratten nach der Verfütterung von alkalisch behandeltem und damit LAL-haltigem Sojaprotein histopathologische Veränderungen von Nierenzellen, auch als Nephrozytomegalie bezeichnet, festgestellt wurden (Woodard und Short 1973). Dabei wurden der Zellkern und das Zytoplasma vergrössert sowie die DNA-Synthese und die Mitose beeinflusst. Doch waren diese Veränderungen nur bei der Ratte und nicht bei anderen Versuchstieren zu beobachten. Zudem wurden dafür nur das freie LAL (in Dosen von mehr als 100 mg/kg) und nicht das proteingebundene LAL (jedoch erst ab 6000 mg/kg) verantwortlich gemacht. Weniger empfindlich gegenüber LAL sind andere Tierarten wie Mäuse, Hamster, Kaninchen, Hunde und Affen, bei denen bis zu einer Menge von 1000 mg/kg freiem LAL keine Wirkung beobachtet wurde (de Groot *et al.* 1976). Mit grosser Wahrscheinlichkeit kann deshalb davon ausgegangen werden, dass proteinhaltige Lebensmittel, die geringe Mengen an LAL enthalten, für den Menschen als sicher einzustufen sind.



Auswertung der untersuchten Proben, ALP

LAL kann in proteinreichen Lebensmitteln vorkommen

Neben dem erstmaligen Nachweis von LAL in alkalisch behandeltem Sojaprotein zeigte die intensive Beschäftigung durch verschiedene Arbeitsgruppen, vor allem in den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts, dass LAL auch in anderen proteinreichen Lebensmitteln vorkommen kann. Dabei war neben der alkalischen Behandlung von Proteinen auch die Erhitzung von Proteinen für deren Bildung ein ausschlaggebender Faktor. In Lebensmitteln ist nach Fritsch und Klostermeyer (1981) freies LAL nur in Spuren vorhanden und proteingebundenes LAL selten in der für eine nephrotoxische Wirkung erforderlichen Konzentration, sodass eine Gefährdung des Menschen in Form einer Nierenschädigung eher unwahrscheinlich ist (de Groot *et al.* 1976; Gould und Mac Gregor 1977). Doch empfiehlt Pfaff (1984) für Kindernährmittel einen LAL-Gehalt von < 200 mg/kg, da für einige Säuglinge und Kinder diese Produkte, die entweder auf Milch- oder Sojabasis beruhen, die einzige Proteinquelle darstellen. Dies auch deshalb, da nicht bekannt ist, ob Säuglinge und Kinder empfindlicher auf den Verzehr von LAL reagieren als Erwachsene. Zwar wurde nach einer zehntägigen Verabreichung von Kindernährmitteln mit unterschiedlichem LAL-Gehalt die Nierenfunktion von Frühgeborenen nicht beeinträchtigt, doch dürfte für eine aussagekräftige Beurteilung dieser Resultate die angewandte Dauer des Versuchs zu kurz gewesen sein (Langhendries *et al.* 1992). Im Weiteren ist die durch die Bildung von LAL verminderte Lysinverfügbarkeit zu erwähnen (de Vrese *et al.* 2000). Dies ist für das Milchprotein jedoch von geringerer Bedeutung, da letzteres relativ reich an Lysin ist. Zudem wurde eine Komplexbildung von LAL mit Spurenelementen wie Kupfer und Zink beobachtet, die zur Inaktivierung von Metalloenzymen führen kann (Hayashi 1982).

LAL gilt in der Lebensmittelindustrie als einer unter vielen Qualitätsparametern für eine gute Herstellungspraxis. Der LAL-Gehalt sollte daher in Lebensmitteln so gering wie möglich gehalten werden.

Methoden für den Nachweis von LAL

Als Bestimmungsmethoden für den Nachweis von LAL in Lebensmitteln kommt neben der Ionenaustausch-Chromatographie, den elektrophoretischen Verfahren, der Dünnschicht-Chromatographie mit Densitometrie und der Gas-Chromatographie auch die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) zur Anwendung. Dabei wird bei letzterer entweder eine Derivatbildung mit Dansylchlorid (Antila *et al.* 1987; Badoud und Pratz 1984; Faist *et al.* 2000; Moret *et al.* 1994; Wood-Rethwill und Warthesen 1980) oder mit 9-Fluorenylmethylchloroformat und einer vorangehenden Festphasen-Extraktion (Pellegrino *et al.* 1996) mit anschliessender massenspektrometrischer Bestimmung (Fenaille *et al.* 2006) vorgenommen.

Ziel dieser Arbeit ist, einen Überblick über die Situation von LAL in Milch und Milchprodukten schweizerischer Herkunft zu erhalten und mit Angaben aus der Literatur zu vergleichen. Des Weiteren soll die an ALP eingesetzte Methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung des LAL-Gehaltes in Milch und Milchprodukten beschrieben werden.

Untersuchung von Milch und Milchprodukten

Nachfolgend aufgeführte Produkte aus dem Handel wurden an ALP auf ihren LAL-Gehalt untersucht: Milch-Drink (4 Proben), Kaffeerahm (4), Vollrahm (3), Kondensmilch (1), Frischkäse (4), Mozzarella (4), Halbhartkäse (1), Schmelzkäse (5), Kaseinate (4): Na-Kaseinat (2), Ca-Kaseinat (1), K-Kaseinat (1), Magermilchpulver (1), sprüh- (3) und walzengetrocknetes (6) Vollmilchpulver, Spezialmilchpulver (13), Milchpulver mit aufgeschlossenem Milchprotein (2) und Kindernährmittel in Pulverform (17).

In flüssiger Milch tritt LAL bisweilen auf

Unter den an ALP untersuchten Proben von Milch und flüssigen Milchprodukten wurde in UHT-Milchdrink, UHT-Vollrahm und Kondensmilch kein LAL nachgewiesen (Tab. 1). Ein UHT-Kaffeerahm-Erzeugnis wies einen erhöhten LAL-Gehalt von 367 mg/kg Protein auf und wurde damit nachweislich stärker wärmebelastet als allgemein üblich.

Dass rohe, pasteurisierte und UHT-Milch LAL enthalten können, wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen der letzten 20 Jahre aufgezeigt (Tab. 2). Dabei konnte in roher, pasteurisierter und UHT-Milch eine Konzentration von nicht nachweisbar bis 186 mg/kg Protein festgestellt werden. In stärker erhitzter wie sterilisierter Milch scheint der LAL-Gehalt mit bis zu 950 mg/kg Protein deutlich höher zu liegen.
Da üblicherweise die LAL-Konzentration in mg/kg Protein angegeben wird, ist diese bezogen auf das Produkt wegen des geringen Proteingehaltes der Milch deutlich tiefer (Tab. 1). Dass rohe Milch LAL enthalten kann – auch wenn frühere Untersuchungen dies nicht zeigen konnten (Dehn-Müller *et al.* 1991; Fritsch und Klostermeyer 1981) – ist auf die Fütterung der Kühe zurückzuführen. Wenn nämlich Kasein-gebundenes LAL verfüttert wird, reichert sich LAL in der Niere an und wird über den Urin ausgeschieden (Faist *et al.* 1998). Bei Ratten, die ein Futter mit wenig (mittlere Aufnahme über 10 Tage: 623 mg) oder viel (3055 mg) Kasein-gebundenem LAL erhielten, wird LAL zu 7,7 resp. 14,4 % über den Kot und zu 5,6 resp. 4,9 % über den Urin ausgeschieden und in den Nieren wird 0,13 resp. 0,78 mg gegenüber 0,06 mg LAL bei den Kontrolltieren nachgewiesen (Somoza *et al.* 2006). Auch beim Menschen wird nach dem Verzehr von LAL-haltigem Kasein eine dosisabhängige Ausscheidung über den Urin festgestellt (Lee und Erbersdobler 1994). Damit ist auch der von Faist *et al.* (2000) festgestellte höhere LAL-Gehalt der Muttermilch zu erklären, denn in den menschlichen Organismus aufgenommene wasserlösliche Substanzen werden nicht nur über den Urin ausgeschieden, sondern auch in die Muttermilch abgesondert, wie wir am Beispiel des CLA bei stillenden Frauen, die CLA-angereicherte Alpbutter zu sich nahmen, zeigen konnten (Bertschi *et al.* 2005).

Tab. 1: Vorkommen von LAL in verschiedenen Milchpulvern (eigene Untersuchungen)

Produkt	n	positiv	LAL-Gehalt mg/kg Produkt	LAL-Gehalt mg/kg Protein
UHT-Milchdrink 2,7 % Fett	4	0	nn	nn
UHT-Vollrahm 35 % Fett	3	0	nn	nn
UHT-Kaffeerahm 15 % Fett	4	1	18	367
Kondensmilch	1	0	nn	nn
Frischkäse	4	1	73	[1]
Mozzarella 18 % Fett	4	1	123	615
Halbhartkäse	1	0	nn	nn
Schmelzkäse	5	0	nn	nn

n = Anzahl Proben
nn = nicht nachweisbar; Nachweisgrenze: 10 mg/kg Produkt
[1] = Proteingehalt nicht bekannt

Tab. 2: LAL-Konzentration in Milch und verschieden behandelten Milchproben (mg/kg Protein) in Publikationen der letzten 20 Jahre

Probe	Antila *et al.* (1987)	Hasegawa *et al.* (1987)	Henle *et al.* (1993)	Pellegrino *et al.* (1996)	Faist *et al.* (2000)[e]	D'Agostina *et al.* (2003)
Nachweisgrenze LAL	**<10**		**<20**	**<0,4**	**1,2**	**0,5**
Milch roh		nn-60 (4)[b]	nn (2)		10; 4-24 (6)	
Milch pasteurisiert	nn-11 (6)			<0,4 (5)	24; 17-47 (5)	
Milch erhitzt		nn-140 (3)[c]			23; 13-69 (3)[f]	
Milch UHT	<10-83 (4)	40 (1)			117; 49-186 (5)	
Milch sterilisiert			950		428; 224-653 (3)	
Milch eingedickt			410-660 (11)			
Milch kondensiert		230 (1)				
Kindernährmittel flüssig	50-70 (2)					Sp-390 (14)
Rahm UHT	17 (1)					
Kaffeerahm sterilisiert			130-1400 (10)			
andere Milchprodukte	nn-56 (12)[a]	80 (1)[d]				
Muttermilch					45; 11-70 (12)[g]	

Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Proben an.
Sp = Spuren, unterhalb der Nachweisgrenze; nn = nicht nachweisbar
[a] = fermentierte Milchprodukte, Drink auf Milchbasis, Ice cream; [b] = nicht gekocht; [c] = während 1 Minute; [d] = Joghurt; [e] = Median und Bereich; [f] = hochpasteurisierte Milch; [g] = 4. Laktationswoche

Eine Bildung von LAL kann nach den Modelluntersuchungen von Faist *et al.* (2000) bei der Verarbeitung von Milch auftreten. Diese Autoren stellten in Milch bei Erhitzungstemperaturen von 60 bis 90°C und einer Heisshaltezeit von 20 Sekunden einen LAL-Gehalt von bis zu 30 mg/kg Protein fest, wobei die unerhitzte Milch bereits einen solchen von 10 mg/kg Protein aufwies. Wurde die Heisshaltezeit auf 160 Sekunden ausgedehnt, erhöhte sich der LAL-Gehalt bei 90°C auf 174 mg/kg Protein. Milch, die einem Hochpasteurisierungsverfahren (110 bis 125°C während 2 s) unterworfen wurde, zeigte jedoch einen LAL-Gehalt von 4,7 (110°C), 8,3 (115°C), 9,6 (120°C) und 13,4 (125°C) im Vergleich zu 4,0 mg/kg Protein in Rohmilch.

LAL in Käse von Herstellung abhängig

Käse enthält praktisch kein LAL, da bei der Herstellung keine für die LAL-Bildung relevante Erhitzung stattfindet (Tab. 1). In der an ALP durchgeführten Untersuchung war LAL lediglich in je einer von vier Frischkäse- und Mozzarellaproben in einer Konzentration von etwa 100 mg/kg Produkt nachweisbar. In den fünf hier untersuchten Schmelzkäseproben konnte kein LAL nachgewiesen werden. Demgegenüber enthielten nach Faist *et al.* (2000) je 10 Proben von Rahmkäse und reifen Hartkäsen sowie von Schmelzkäse einen LAL-Gehalt von 18 bis 96, <3 bis 83 und 95 bis 374 mg/kg Protein (Tab. 3). Doch waren diese Käse aus pasteurisierter Milch hergestellt worden und wie die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigten, ist in pasteurisierter Milch ein LAL-Gehalt von bis zu 47 mg/kg Protein nachzuweisen. Nach Pellegrino *et al.* (1996) lag er in 20 Schmelzkäseproben zwischen 15 und 421 mg/kg Protein. Dabei scheint die Verwendung von Labkasein wie auch von Milchproteinen bei deren Herstellung die LAL-Konzentration im Endprodukt nicht zu beeinflussen. Diese Autoren haben zudem umfangreiche Untersuchungen zum Vorkommen von LAL in Mozzarella durchgeführt. Dabei konnten sie in 12 Proben von Imitations-Mozzarella, der üblicherweise aus Labkasein und Kaseinaten hergestellt wird, eine LAL-Konzentration von 15 bis 329 mg/kg Protein bestimmen im Vergleich zu 30 natürlichen Mozzarellaproben mit 0,6 bis 3,8 mg/kg Protein. Der hohe Gehalt in Imitations-Mozzarella könnte mit der Verwendung von Labkasein (n=9) und Kalziumkaseinat (n=5) erklärt werden, die 21 bis 178 mg LAL/kg Protein und 128 bis 2992 mg LAL/kg Protein enthielten.

Tab. 3: LAL-Konzentration in Milchprodukten (mg/kg Protein) in Publikationen der letzten 20 Jahre

Milchprodukt	**Antila *et al.* (1987)**	**Henle *et al.* (1993)**	**Pellegrino *et al.* (1996)**	**Faist *et al.* (2000)**
Nachweisgrenze LAL	**<10**	**<20**	**<0,4**	**1,2**
Milchpulver (alle Typen)	nn-103 (6)	nn-150 (3)	4-9 (3)	
Kindernährmittel (in Pulverform)	28-351 (7)			14,88
Molkenpulver	nn-22 (5)	nn-780 (3)	3 (1)	
Säurekasein	nn,17			
Labkasein			114 (9)	
Kaseinate	nn,108			
Natriumkaseinat	139,143	50-2200 (12)	5390 (1)[a]	
Kalziumkaseinat			128-2992 (5)	
Käse	nn (11) 20 (1)		0,4-4,0 (32)	85[b] (10)[c] 27[b] (10)[d]
Imitationskäse			15-329 (12)	121, 462
Schmelzkäse	15-52 (4)		15-421 (20)	373[b] (10)

Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Proben an.

Sp = Spuren, unterhalb der Nachweisgrenze; nn = nicht nachweisbar

[a] = für längere Zeit bei warmen Bedingungen gelagert; [b] = Median; [c] = Rahmkäse; [d] = reifer Hartkäse

LAL in Milchpulver und Proteinkonzentraten

In getrockneten Milchprodukten stellt sich die Situation in Bezug auf das Vorkommen von LAL anders dar. In den vier untersuchten Kaseinatpulvern sowie einer Magermilchpulverprobe aus dem Handel war kein LAL nachweisbar. Diese Kaseinate wurden vermutlich mit Karbonat- und Zitratsalzen oder durch vorsichtige stufenweise Zugabe von Natronlauge unter ständiger pH-Kontrolle (pH-Wert < 8) aufgeschlossen. Dagegen wiesen 8 von 13 Spezialmilchpulverproben einen erhöhten LAL-Gehalt von 68 bis 712 mg/kg Produkt resp. 152 bis 881 mg/kg Protein auf. In zwei Vollmilchpulverproben wurde sogar eine LAL-Konzentration von über 200 mg/kg Produkt bzw. etwa 1000 mg/kg Protein bestimmt. In zwei Proben von Milchpulvern mit aufgeschlossenem Milchprotein, vermutlich auf der Basis von partiell alkalihydrolysiertem Milchprotein, war diese zum Teil noch höher. Des Weiteren wurde in 16 von 17 Proben von Kindernährmitteln in Pulverform eine erhöhte LAL-Konzentration nachgewiesen (Tab. 4). Die grosse Schwankungsbreite im LAL-Gehalt bei Milch und Milchprodukten und im Speziellen bei Milchpulvern ist in erster Linie auf unterschiedliche Temperaturbelastungen und Erhitzungszeiten während der Herstellung zurückzuführen.

Dass vor allem getrocknete Proteinkonzentrate, weniger aber getrocknete Milchprodukte einen erhöhten LAL-Gehalt aufweisen können, wurde bereits verschiedentlich aufgezeigt (Tab. 3). Entscheidend für die Bildung von LAL sind die Intensität der Hitzebehandlung sowie der pH-Wert des wässrigen Milieus. Wurde Säurekasein bei pH 10 auf 90°C erhitzt, stieg die LAL-Konzentration bis zur 12. Stunde kontinuierlich an. Dabei zeigte sich vor allem im alkalischen Bereich ein starker Anstieg in der LAL-Konzentration (Holstein, 1980). Deshalb hat Fritsch bereits 1984 darauf hingewiesen, dass bei der Herstellung von Kaseinaten alkalische Medien wie Natronlauge genau dosiert, stufenweise zugegeben und der pH-Wert kontrolliert werden sollten. Auch muss die Aufschlusstemperatur unter 95°C gehalten werden.

Tab. 4: Vorkommen von LAL in verschiedenen Milchpulvern (eigene Untersuchungen)

Produkt	n	positiv	LAL-Gehalt mg/kg Produkt	LAL-Gehalt mg/kg Protein
Magermilchpulver	1	0	nn	nn
Vollmilchpulver (sprühgetrocknet)	3	2	9, 15	34, 60
Vollmilchpulver (walzengetrocknet)	6	4	9, 14, 222, 252	37, 55, 963, 1123
Milchproteinpulver (Spezialmilchpulver)	8	4	105, 193, 270, 368	148, 248, 345, 438
Molkenproteinpulver (Spezialmilchpulver)	5	4	68, 100, 246, 712	152, 123, 316, 881
Milchpulver mit aufgeschlossenem Milchprotein	2	2	531, 1949	613, 2296
Kaseinat (Na-,Ca-, K-)	4	0	nn	nn
Kindernährmittel (in Pulverform)	17	16	9, 13, 19, 24, 67, 67, 97, 112, 113, 135, 143, 159, 163, 209, 259, 334	-[1], -[1], -[1], -[1], 451, 451, 651, -[1], -[1], 1421, 1276, 1067, 1333, 1499, 1630, -[1]

n = Anzahl Proben

nn = nicht nachweisbar; Nachweisgrenze: 10 mg/kg Produkt

[1] = Proteingehalt nicht bekannt

Untersuchung der Proben auf den LAL-Gehalt an ALP

Bei der an ALP eingesetzten Bestimmungsmethode handelt es sich um eine Modifikation der beschriebenen Methoden von Badoud und Pratz (1984), Moret *et al.* (1994) und Faist *et al.* (2000). Die Proben werden mit 6 mol/L Salzsäure während 22 Stunden bei 110°C hydrolysiert. 200 µL Hydrolysatlösung werden mit der gleichen Menge interner Standardlösung (n-Methyllysin) versetzt und anschliessend mit Dansylchlorid derivatisiert. Die Zentrifugengläser werden während 30 Minuten in ein 40°C warmes Wasserbad gestellt und ca. alle 10 Minuten umgeschwenkt. Dann werden 200 µL Natriumglutaminatlösung zugegeben, während weiteren 60 Minuten im Wasserbad stehen gelassen und gelegentlich umgeschwenkt. Nach dem Abkühlen wird 1 mL Ethylazetat zugegeben, auf dem Reagenzienmixer sehr gut gemischt und dann während 10 Minuten zentrifugiert (4000 U/min). Ein mL der oberen Phase wird in ein 50 mL Spitzkölbchen pipettiert und bei 40°C zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 200 µL Acetonitril-Wasser-Gemisch (2:1) aufgenommen. Die Proben werden durch einen Einwegfilter in ein Autosampler-Fläschchen (300 µL) filtriert und sind nun bereit für die Chromatografie. Dazu wurde eine C18-Trennsäule (5 µm 250x4 mm, z.B. Hypersil ODS von Agilent Art. 79926OD-584) verwendet. Die Bedingungen der mobilen Phase A waren 800 mL Phosphatpufferlösung sowie 200 mL Acetonitril und der mobilen Phase B 200 mL Phosphatpufferlösung und 800 mL Acetonitril. Der Fluss betrug 1 mL/min, das Einspritzvolumen 5 µL, die Säulentemperatur 35°C. Die Detektion wurde mit Fluoreszenzlicht bei einer Wellenlänge von 218 nm für die Anregung und von 530 nm für die Emission ausgeführt. Die Laufzeit betrug 30 Minuten. Dabei wurde der Gradient der mobilen Phasen folgendermassen variiert: Der Eluent B wurde von 15 (0 min) auf 25 (10 min), 30 (20 min), 90 (22 min) und 15% (24,1 min) verändert.

LAL konnte mit dieser Bestimmungsmethode klar aufgetrennt und quantifiziert werden. Dazu wurde einer Probe LAL zugesetzt, das mit Hilfe der HPLC deutlich von anderen Peaks abgetrennt werden konnte (siehe Abb. 2). Die Nachweisgrenze betrug 10 mg/kg Produkt.

Folgerungen

LAL ist ein Bestandteil von verarbeiteten proteinhaltigen Lebensmitteln. In der Qualitätssicherung kann er als ein Parameter für die verwendeten Verarbeitungsmethoden herbeigezogen werden. Bei der Verwendung von schonenden Verarbeitungsschritten kann die LAL-Konzentration im Endprodukt auf einem tiefen Niveau gehalten werden. Unter den verschiedenen Milchprodukten sind vor allem getrocknete Proteinkonzentrate für einen hohen LAL-Gehalt gefährdet. Dabei sind die angewendeten Bedingungen der Temperaturbehandlung sowie der eingesetzte pH-Wert bei der Gewinnung von Milchproteinen ausschlaggebend für eine LAL-Bildung.

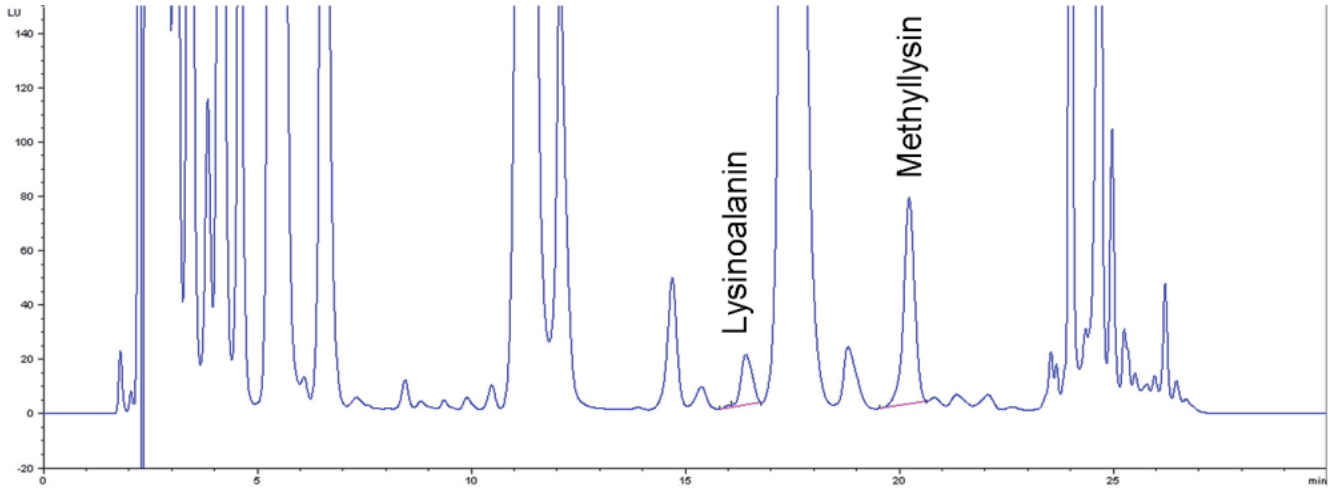


Abb. 2: HPLC-Auftrennung einer Vollmilchpulverprobe mit zugesetztem Lysinoalanin und Methyllysin als internem Standard

Résumé

Présence de lysinoalanine dans le lait et les produits laitiers

Produit secondaire indésirable, la lysinoalanine (LAL) est engendrée lors du traitement alcalin de protéines ou lors du chauffage de denrées alimentaires contenant des protéines. En raison de leur présence voisine, la déhydroalanine et la lysine réagissent ensemble par le biais du groupe aminé **ε** de la lysine. Étant donné que la liaison est largement irréversible, la valorisation de la partie lysine est totalement ou en grande partie bloquée. Grâce à l'amélioration d'une méthode d'analyse, la teneur en LAL du lait et de divers produits laitiers prélevés dans le commerce a été déterminée. Les produits UHT (lait drink, crème entière, crème à café et lait condensé) analysés par ALP ne contenaient en général aucune trace de LAL. Seule une crème à café UHT a enregistré une teneur élevée en LAL. En outre, la fabrication de fromage n'a entraîné aucune formation notable de LAL. Quant aux caséinates analysés, ils ne contenaient pas de LAL, par contre différents laits en poudre de même que des aliments en poudre pour enfants ont enregistré parfois des teneurs élevées en LAL. En plus, le lait en poudre avec des protéines du lait hydrolysé contenaient jusqu'à 2296 mg LAL/kg de protéines. Dans l'assurance de la qualité des denrées alimentaires, la LAL sert d'indicateur. Si la proportion de LAL est élevée dans l'échantillon, cela signifie que le lait ou le produit laitier a été exposé lors du traitement thermique à des températures trop élevées ou a été traité trop longtemps. La grande marge de fluctuation dans les teneurs en LAL dans le lait et les produits laitiers est à mettre en premier lieu sur les différentes charges thermiques et durées de chauffage.

Summary

Occurrence of lysinoalanine in milk and dairy products

Lysinoalanine (LAL) is produced as an undesirable secondary product during alkaline treatment of proteins or the heating of foodstuffs containing proteins. Because of their closeness, dehydroalanine reacts with the lysine **ε**-amino group. Since the reaction is largely irreversible, the value of the lysine content is almost completely or totally blocked. Due to an improvement in an analytical method, the LAL content of milk and various commercial dairy products was determined. UHT products (drink milk, full cream, coffee cream and condensed milk) analyzed by ALP generally did not contain traces of LAL. Only one UHT coffee cream showed higher levels of LAL. Moreover, cheese manufacture did not lead to any notable formation of LAL. The analyzed caseinates did not contain LAL, however, different dried milk products as well as powdered food for children sometimes contained high levels of LAL. Moreover, milk powders with hydrolyzed milk proteins contained up to 2296 mg LAL/kg of proteins. LAL is used as indicator for heat treatment in the quality assurance of foodstuffs. If the proportion of LAL is high in the sample, this means that the milk or the dairy product was exposed to too high temperatures at the time of treatment or was treated for too a long period. The large fluctuation in the LAL contents of milk and dairy products is mainly due to different heat loads and duration of heating.

Literatur

Antila P., Pullinen E. & Antila V., 1987.
The formation and determination of lysinoalanine in foods containing milk protein.
Finn. J. Dairy Sci. 45, 1-18.

Badoud R. & Pratz G., 1984.
Simple and rapid quantitative determination of lysinoalanine and protein hydrolysate amino acids by high-performance liquid chromatography after derivatization with dansyl chloride.
Chromatographia 19, 155-164.

Bertschi I., Collomb M., Rist L., Eberhard P., Sieber R., Bütikofer U., Wechsler D., Folkers G. & von Mandach U., 2005.
Maternal dietary alpine butter intake affects human milk: fatty acids and conjugated linoleic acid isomers.
Lipids 40, 581-587.

Bohak Z., 1964.
Nε-(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine, a new amino acid formed on alkaline treatment of proteins.
J. Biol. Chem. 239, 2878-2887.

D'Agostina A., Boschin G., Rinaldi A. & Arnoldi A., 2003.
Updating on the lysinoalanine content of commercial infant formulae and beicost products.
Food Chem. 80, 483-488.

De Groot A.P., Slump P., Feron V.J. & van Beek L., 1976.
Effects of alkali-treated proteins: Feeding studies with free and protein-bound lysinoalanine in rats and other animals.
J. Nutr. 106, 1527-1538.

De Vrese M., Frik R., Roos N. & Hagemeister H., 2000.
Protein-bound D-amino acids, and to a lesser extent lysinoalanine, decrease true ileal protein digestibility in minipigs as determined with ^{15}N-labeling.
J. Nutr. 130, 2026-2031.

Dehn-Müller B., Müller B. & Erbersdobler H.F., 1991.
Untersuchungen zur Proteinschädigung in UHT-Milch.
Milchwissenschaft 46, 431-434.

Holstein, A.B. 1979.
Modelluntersuchungen über die Bildung von Lysinoalanin bei Hitzebehandlung von Proteinen.
Diss. Univ. München 79S.

Faist V., Drusch S., Kiesner C., Elmadfa I. & Erbersdobler H.F., 2000. Determination of lysinoalanine in foods containing milk protein by high-performance chromatography after derivatisation with dansylchloride.
Int. Dairy J. 10, 339-346.

Faist, V., Wenzel, E., Tasto, S., Müller, C., & Erbersdobler, H. F., 1998.
Tissue specific induction of phase I and II xenobiotic enzymes and oxygen free radical metabolism in rats fed alkali-treated protein containing high levels of lysinoalanine.
FASEB J., 13, 1268.

Fenaille F., Parisod V., Visani P., Populaire S., Tabet J.C. & Guy P.A., 2006.
Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study.
Int. Dairy J. 16, 728-739.

Friedman M., 1999.
Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins.
J. Agric. Food Chem. 47, 1295-1319.

Fritsch R.J. 1984.
Analytik, Entstehen und Vorkommen von Lysinoalanin in milcheiweisshaltigen Lebensmitteln.
Dt. Milchwirt. 35, 1932-1935.

Fritsch R.J. & Klostermeyer H., 1981.
Bestandesaufnahme zum Vorkommen von Lysinoalanin in milcheiweisshaltigen Lebensmitteln.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 172, 440-445.

Gould D.H. & Mac Gregor J.T., 1977.
Biological effects of alkali-treated protein and lysinoalanine: an overview.
Adv. Exp. Med. Biol. 86B, 29-48.

Hasegawa K., Mukai K., Gotoh M., Honjo S. & Matoba T., 1987.
Determination of the lysinoalanine content in commercial foods by gas chromatography-selected ion monitoring.
Agric. Biol. Chem. 51, 2889-2894.

Hayashi, R., 1982.
Lysinoalanine as a metal chelator. An implication for toxicity.
J. Biol. Chem. 257, 13896-13898.

Henle T., Walter A.W. & Klostermeyer H., 1993.
Detection and identification of the cross-linking amino acids N^{T}- and N^{TT}-(2'-amino-2'-carboxy-ethyl)-L-histidine («histidinoalanine», HAL) in heated milk products.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 197, 114-117.

Langhendries J.P., Hurrell R.F., Furniss D.E., Hischenhuber C., Finot P.A., Bernard A., Battisti O., Bertrand J.M. & Senterre J., 1992.
Maillard reaction products and lysinoalanine: urinary excretion and the effects on kidney function of preterm infants fed heat-processed milk formula.
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 14, 62-70.

Lee, K.-H., & Erbersdobler, H. F. (1994).
Balance experiments on human volunteers with ε-fructoselysine and lysinoalanine. In: Maillard reactions in chemistry, food and health. Proceedings of the fifth international symposium on Maillard browning (Ed. T. P. Labuza, G. A. Reineccius, V. M. Monnier, J. O'Brien, & J. W. Baynes).
The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 358-363.

Moret S., Cherubin S., Rodriguez-Estrada M.T. & Lercker G., 1994.
Determination of lysinoalanine by high performance liquid chromatography.
J. High Resolut. Chromatogr. 17, 827-830.

Pellegrino L., Resmini P., Denoni I. & Masotti F., 1996.
Sensitive determination of lysinoalanine for distinguishing natural from imitation mozzarella cheese.
J. Dairy Sci. 79, 725-734.

Pfaff G., 1984.
Lysinoalanine contents of formula diets.
Lancet I, 448.

Sternberg M., Kim C.Y. & Schwende F.J., 1975.
Lysinoalanine: presence in foods and food ingredients.
Science 190, 992-994.

Somoza V., Wenzel E., Weiss C., Clawin-Rädecker I., Grübel N., Erbersdobler H.F., 2006.
Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats.
Mol. Nutr. Food Res. 50, 833-841.

Wood-Rethwill J.C. & Warthesen J.J., 1980.
Lysinoalanine determination in proteins using high-pressure liquid chromatography.
J. Food Sci. 45, 1637-1640.

Woodard J.C. & Short D.D., 1973.
Toxicity of alkali-treated soyprotein in rats.
J. Nutr. 103, 569-574.