



Présence de lysinoalanine dans le lait et les produits laitiers

R. SIEBER, U. BÜTIKOFER, N. KALDAS et B. REHBERGER, Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, 3003 Berne

E-mail: ueli.buetikofer@alp.admin.ch
Tél. (+41) 31 32 38 482, fax (+41) 31 32 38 227.

Résumé

Produit secondaire indésirable, la lysinoalanine (LAL) est engendrée par le traitement alcalin des protéines ou le chauffage de denrées alimentaires contenant des protéines. En cas de présence simultanée, la déhydroalanine et la lysine interagissent par le biais du groupe aminé ϵ de la lysine. La liaison étant pratiquement irréversible, la valorisation de la partie lysine est totalement ou en grande partie bloquée. La teneur en LAL du lait et de divers produits laitiers prélevés dans le commerce a été déterminée grâce à l'amélioration d'une méthode d'analyse. 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 avait une teneur élevée en LAL. En outre, la fabrication de fromage n'a entraîné aucune formation notable de LAL. Les caséinates analysés n'en contenaient pas. Par contre, différentes sortes de lait en poudre de même que des aliments pour enfants en poudre possédaient parfois des teneurs élevées en LAL. Les laits en poudre avec des protéines du lait hydrolysé contenaient jusqu'à 2296 mg LAL/kg de protéines. La LAL sert d'indicateur dans l'assurance qualité des denrées alimentaires. En effet, si la proportion de LAL est élevée dans un 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 chauffé trop longtemps. La grande fluctuation observée dans les teneurs en LAL dans le lait et les produits laitiers est due avant tout aux différentes charges thermiques et durées de chauffage.

Au début des années septante, les chercheurs en science alimentaire se sont fortement intéressés à la LAL, car des changements histopathologiques des cellules rénales, appelés aussi néphrocytomégalie, avaient été observés, dans des essais avec des rats, après la consommation de protéines de soja ayant subi un traitement alcalin et contenant donc de la LAL (Woodard et Short, 1973). A la suite du traitement, le noyau de la cellule et le cytoplasme avaient grossi et la synthèse d'ADN de même que la mitose avaient été influencées. Toutefois, ces modifications n'ont été observées que chez les rats et étaient dues à la LAL libre (en doses de plus de 100 mg/kg) et non pas à la LAL liée aux protéines (seulement à partir de 6000 mg/kg). D'autres animaux comme les souris, les hamsters, les lapins, les chiens et les singes sont moins sensibles à la LAL. Chez ces animaux, des doses de plus de 1000 mg/kg de LAL libre n'ont eu aucun effet (de Groot *et al.*, 1976). En conséquence, les aliments protéiniques qui contiennent de faibles quantités de LAL sont, selon toute vraisemblance, sans danger dans l'alimentation humaine.

Après les premières détections de LAL dans les protéines de soja traitées de façon alcaline, différents groupes de tra-

Introduction

La lysinoalanine (N^ε-(DL-2-amino-2-carboxyéthyle)-L-lysine (LAL) (fig.1) est un acide aminé basique qui peut être engendré par le traitement alcalin des protéines (lors de la recherche de propriétés fonctionnelles) ou par le chauffage modéré des denrées alimentaires en présence d'un pH neutre (Bohak, 1964; Sternberg *et al.*, 1975). La LAL n'est pas un dipeptide, car ce composé ne contient aucun groupe peptidique et ne forme donc pas deux acides aminés après hydrolyse. A l'instar de l'histidinoalanine et d'autres acides aminés *crosslink*, la LAL fait partie des *cross-*

linkings d'une protéine. La LAL se forme lorsqu'il y a présence simultanée de la déhydroalanine et de la lysine. Ces deux substances interagissent par le biais du groupe aminé ϵ de la lysine.

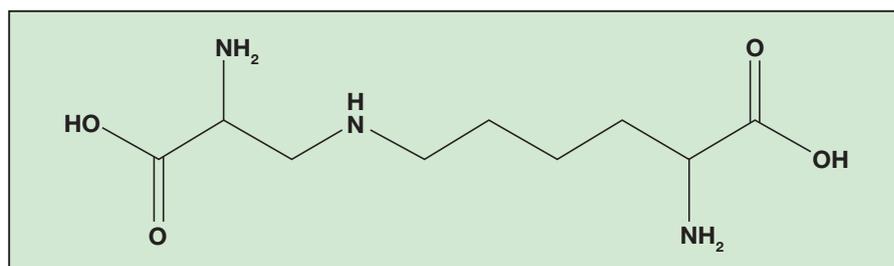


Fig. 1. Formule chimique de la lysinoalanine.

vail ont montré dans les années septante et huitante que la LAL pouvait aussi être présente dans d'autres aliments riches en protéines. En plus du traitement alcalin, le chauffage de ceux-ci s'est aussi avéré un facteur déterminant dans la formation de la LAL. Selon Fritsch et Klostermeyer (1981), la LAL libre n'est présente dans les aliments que sous la forme de traces et celle liée aux protéines n'atteint jamais des concentrations toxiques pour les reins, de sorte qu'une mise en danger de la santé humaine par une atteinte de ces organes est plutôt improbable (de Groot *et al.*, 1976; Gould et Mac Gregor, 1977). Pourtant, Pfaff (1984) recommande de ne pas dépasser 200 mg LAL/kg pour les aliments destinés aux enfants, vu que ces produits, à base de lait ou de soja, représentent la seule source de protéines pour certains nourrissons et enfants. Cette recommandation tient aussi compte du fait que leur réaction à la consommation de LAL n'est pas connue. La fonction des reins de prématurés sous examen n'a certes pas été perturbée par la consommation pendant dix jours d'aliments pour enfants ayant différentes teneurs en LAL, mais la durée de l'essai était trop courte pour une évaluation fiable des résultats (Langhendries *et al.*, 1992). De plus, il faut tenir compte de la disponibilité réduite de la lysine due à la formation de LAL (de Vrese *et al.*, 2000). Cela est moins important pour les protéines du lait, qui sont relativement riches en lysine. D'autres chercheurs ont observé la formation de complexes de LAL avec des éléments traces comme le cuivre et le zinc capables d'entraîner l'inactivation d'enzymes métalliques (Hayashi, 1982). La LAL est considérée dans l'industrie alimentaire comme un paramètre de qua-

lité parmi d'autres de la bonne pratique de fabrication. La teneur en LAL dans les aliments devrait donc être maintenue aussi basse que possible.

En plus de la chromatographie par échange d'ions, des procédés par électrophorèse, de la chromatographie sur couche mince, couplée à la densitométrie, et de la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est aussi utilisée pour détecter la LAL dans les denrées alimentaires. Avec cette dernière méthode, il faut procéder à une dérivation avec du chlorure de dansyle (Antila *et al.*, 1987; Badoud et Pratz, 1984; Faist *et al.*, 2000; Moret *et al.*, 1994; Wood-Rethwill et Warthesen, 1980) ou avec du 9-fluorénylméthylchloroformate et à une extraction préalable sur phase solide (Pellegrino *et al.*, 1996), suivie d'une détermination par spectrométrie de masse (Fenaille *et al.*, 2006).

Cette étude visait à obtenir un aperçu de la situation de la LAL dans le lait et les produits laitiers d'origine suisse et à comparer les données obtenues avec la littérature à ce sujet. Elle visait aussi à décrire la méthode employée dans les laboratoires d'ALP pour analyser qualitativement et quantitativement la teneur en LAL du lait et des produits laitiers.

Matériel et méthodes

Analyse de lait et de produits laitiers du commerce

La teneur en LAL des produits suivants prélevés dans le commerce a été analysée dans les laboratoires d'ALP: lait drink (quatre échantillons), crème à café (4), crème en-

tière (3), lait condensé (1), fromage frais (4), mozzarella (4), fromage à pâte mi-dure (1), fromage fondu (5), caséinate (4): caséinate de sodium (2), caséinate de calcium (1), caséinate de potassium (1), poudre de lait écrémé (1), poudre de lait entier séché par atomisation (3) et sur cylindres (6), poudre de lait spécial (13), poudre de lait avec des protéines hydrolysées (2) et aliments en poudre pour enfants (17).

Analyse de la teneur en lysinoalanine des échantillons

Bien que modifiée, la méthode utilisée chez ALP est celle décrite par Badoud et Pratz (1984), Moret *et al.* (1994) ainsi que par Faist *et al.* (2000). Les échantillons sont hydrolysés avec 6 mol/l d'acide chlorhydrique pendant vingt-deux heures à 110 °C. On ajoute à 200 µL d'hydrolysate la même quantité de solution d'un standard interne (n-méthyllysine). Ce mélange est ensuite dérivatisé avec du chlorure de dansyle. Les éprouvettes de centrifugation sont ensuite placées pendant trente minutes dans un bain-marie à 40 °C et retournées environ toutes les dix minutes. Après l'ajout de 200 µL de solution de glutamate de sodium, le mélange est placé dans un bain-marie pendant soixante minutes et retourné de temps à autre. Après le refroidissement, on ajoute 1 ml d'acétate d'éthyle, on mélange bien avec le mélangeur à éprouvettes et le tout est centrifugé pendant dix minutes (4000 t/min). On prélève 1 ml de la phase supérieure à la pipette dans un ballon conique de 50 ml que l'on traite à la vapeur sèche à 40 °C. Le résidu est repris dans un mélange de 200 µl d'acétonitrile et d'eau (2:1). Les échantillons sont filtrés avec un filtre jetable et versés dans des flacons placés sur un distributeur d'échantillons (300 µl) et sont désormais prêts pour la chromatographie. Une colonne de séparation C18 (5 µm 250 × 4 mm), par exemple hypersil ODS d'Agilent (art. 79926OD-584), a été utilisée à cet effet. Les conditions de la phase mo-

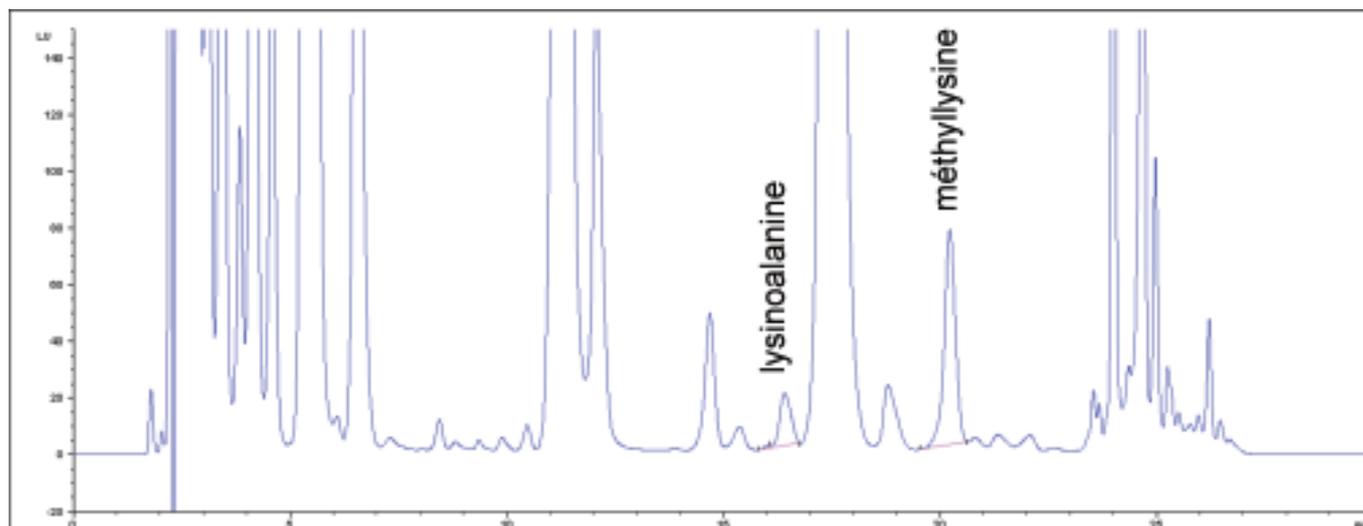


Fig. 2. Séparation par HPLC d'un échantillon de poudre de lait entier contenant de la lysinoalanine ajoutée et de la méthyllysine comme standard interne.

bile A étaient les suivantes: 800 ml de solution tampon au phosphate et 200 ml d'acétonitrile. Celles de la phase mobile B étaient de 200 ml de solution tampon au phosphate et de 800 ml d'acétonitrile. Le débit s'élevait à 1 ml/min, le volume d'injection était de 5 µl, la température de la colonne de 35 °C. La détection a été effectuée par fluorescence à une longueur d'onde de 218 nm pour l'excitation et de 530 nm pour l'émission. Ce processus a duré trente minutes. Le gradient des phases mobiles a varié de la façon suivante: l'éluant B a été modifié de 15% (0 min) à 25% (10 min), à 30% (20 min), à 90% (22 min) et à 15% (24,1 min).

Avec cette méthode de détermination, la LAL a pu être clairement séparée et quantifiée. En plus, de la LAL a été ajoutée à un échantillon, lequel a pu être clairement séparé d'autres pics par HPLC (fig. 2). La limite de détection se situait à 10 mg/kg de produit.

Résultats et discussion

Présence partielle de LAL dans le lait

Aucune trace de LAL n'a été détectée ni dans le lait drink UHT ni dans la crème entière UHT ni dans le lait condensé (tabl.1). Une seule crème à café UHT avait une teneur en LAL élevée (367 mg/kg de protéines). Il est évident que ce produit a subi une charge thermique anormalement forte.

Des études menées au cours des vingt dernières années ont démontré que le lait UHT pasteurisé pouvait contenir de

Tableau 1. Présence de LAL dans différents produits laitiers (analyses d'ALP).

Produit	n	pos.	Teneur en LAL (mg/kg de produit)	Teneur en LAL (mg/kg de protéines)
Lait drink UHT 2,7% de MG	4	0	nd	nd
Crème entière UHT 35% de MG	3	0	nd	nd
Crème à café 15% de MG	4	1	18	367
Lait condensé	1	0	nd	nd
Fromage frais	4	1	73	1
Mozzarella 18% de MG	4	1	123	615
Fromage à pâte mi-dure	1	0	nd	nd
Fromage fondu	5	0	nd	nd

nd = non détectable; limite de détection: 10 mg/kg de produit; pos = positif.
¹Teneur en protéines inconnue.

la LAL (tabl. 2). Des concentrations allant du domaine du non détectable jusqu'à 186 mg/kg de protéines ont été relevées dans le lait cru, le lait pasteurisé et le lait UHT. Dans le lait fortement chauffé de même que dans le lait stérilisé, la teneur en LAL semble être beaucoup plus élevée (jusqu'à 950 mg/kg de protéines). Comme la concentration en LAL est habituellement indiquée en mg/kg de protéines, cette valeur dans le lait est nettement plus basse puisque ce produit a une faible teneur en protéines (cf. tabl.1). Quant au lait cru, il peut aussi contenir de la LAL provenant de l'alimentation des vaches, même si les études antérieures à ce sujet n'ont pas

pu le démontrer (Dehn-Müller *et al.*, 1991; Fritsch et Klostermeyer, 1981). En effet, lorsque de la LAL liée à la caséine est distribuée aux vaches, elle s'accumule dans les reins et est excrétée avec l'urine (Faist *et al.*, 1998). Chez les rats qui ont reçu une alimentation pauvre (prise moyenne pendant dix jours: 623 mg) ou riche en LAL liée à la caséine (3055 mg), la LAL a été évacuée à respectivement 7,7 et 14,4% dans les excréments et à respectivement 5,6 et 4,9% dans l'urine. Dans les reins, la concentration s'élevait à respectivement 0,13 et 0,78 mg, comparé aux animaux de contrôle (0,06 mg) (Somoza *et al.*, 2006). Chez

Tableau 2. Concentration de LAL dans le lait et différents échantillons de lait traités (mg/kg de protéines) (données tirées de publications parues au cours des vingt dernières années).

Echantillon	Antila <i>et al.</i> (1987)	Hasegawa <i>et al.</i> (1987)	Henle <i>et al.</i> (1993)	Pellegrino <i>et al.</i> (1996)	Faist <i>et al.</i> (2000) ^e	D'Agostina <i>et al.</i> (2003)
Limite de détection de la LAL	< 10		< 20	< 0,4	1,2	0,5
Lait cru		nd-60 (4) ^b	nd (2)		10; 4-24 (6)	
Lait pasteurisé	nd-11 (6)			< 0,4 (5)	24; 17-47 (5)	
Lait chauffé		nd-140 (3) ^c			23; 13-69 (3) ^f	
Lait UHT	< 10-83 (4)	40 (1)			117; 49-186 (5)	
Lait stérilisé			950 (1)		428; 224-653 (3)	
Lait épais			410-660 (11)			
Lait condensé		230 (1)				
Aliments liquides pour enfants	50-70 (2)					tr-390 (14)
Crème UHT	17 (1)					
Crème à café stérilisée			130-1400 (10)			
Autres produits laitiers	nd-56 (12) ^a	80 (1) ^d				
Lait maternel					45; 11-70 (12) ^g	

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'échantillons analysés.

tr = traces au-dessous de la limite de détection; nd = non détectable.

^aProduits laitiers fermentés, boissons à base de lait, crème glacée; ^bpas cuit; ^cpendant une minute; ^dyogourt; ^emédiane et domaine; ^fLait hautement pasteurisé; ^g4^e semaine de lactation.

les humains aussi, après la consommation de caséine contenant de la LAL, l'urine contenait une concentration proportionnelle à la dose ingérée (Lee et Erbersdobler, 1994). Ainsi, ces observations expliquent la teneur élevée en LAL dans le lait maternel relevée par Faist *et al.* (2000). Dans l'organisme humain, les substances hydrosolubles ingérées ne sont pas seulement excrétées par l'urine, mais se retrouvent aussi dans le lait maternel. ALP a étudié ce phénomène à travers les CLA dans un essai avec des femmes allaitant leur enfant et qui avaient consommé du beurre de montagne enrichi aux CLA (Bertschi *et al.*, 2005).

Selon des analyses de Faist *et al.* (2000), effectuées à partir de modélisations, la LAL peut se former lors de la transformation du lait. Ces auteurs ont relevé dans le lait chauffé de 60 à 90 °C pendant 20 secondes une teneur en LAL allant jusqu'à 30 mg/kg de protéines. A noter que le lait non chauffé contenait déjà 10 mg LAL/kg de protéines. Si la durée de chauffage s'élevait à 160 secondes, la teneur en LAL augmentait à 174 mg/kg de protéines à 90 °C. Le lait soumis à une pasteurisation haute (110 à 125 °C pendant 2 s) présentait toute-fois une teneur en LAL de 4,7 (110 °C), de 8,3 (115 °C), de 9,6 (120 °C) et de 13,4 (125 °C), comparée aux 4 mg/kg de protéines dans le lait cru.

Présence de LAL dans le fromage due au procédé de fabrication

Le fromage ne contient pratiquement pas de LAL, car il n'est pas chauffé à des températures favorisant sa formation (tabl.1). Dans les essais menés par ALP, la LAL a été détectée dans un seul des quatre échantillons de fromage frais et dans un seul des quatre échantillons de mozzarella, à une concentration d'environ 100 mg/kg de produit. Dans les cinq échantillons de fromage fondu analysés, aucune trace de LAL n'a été détectée.

Cependant, selon Faist *et al.* (2000), dix échantillons de fromage à la crème, dix échantillons de fromage à pâte dure arrivé à maturité de même que dix de fromages fondus contenaient de la LAL dans les concentrations suivantes: de 18 à 96, de < 3 à 83 et de 95 à 374 mg/kg de protéines (tabl. 3). Toutefois, ces fromages avaient été fabriqués avec du lait pasteurisé et, comme l'ont montré leurs analyses, des concentrations de LAL allant jusqu'à 47 mg/kg de protéines sont possibles dans le lait pasteurisé. Pellegrino *et al.* (1996) ont détecté dans

Tableau 3. Concentration de LAL dans les produits laitiers (mg/kg de protéines) (données tirées de publications parues au cours des vingt dernières années).

Produit laitier	Antila <i>et al.</i> (1987)	Henle <i>et al.</i> (1993)	Pellegrino <i>et al.</i> (1996)	Faist <i>et al.</i> (2000)
Limite de détection de la LAL	< 10	< 20	< 0,4	1,2
Lait en poudre (tous types)	nd-103 (6)	nd-150 (3)	4-9 (3)	
Aliments en poudre pour enfants	28-351 (7)			14,88 (2)
Petit-lait en poudre	nd-22 (5)	nd-780 (3)	3 (1)	
Caséine acide	nd,17 (2)			
Caséine présure			114 (9)	
Caséinates	nd,108 (2)			
Caséinate de sodium	139,143 (2)	50-2200 (12)	5390 (1) ^a	
Caséinate de calcium			128-2992 (5)	
Fromage	nd (11) 20 (1)		0,4-4,0 (32)	85 ^b (10) ^c 27 ^b (10) ^d
Imitation de fromage			15-329 (12)	121,462 (2)
Fromage fondu	15-52 (4)		15-421 (20)	373 ^b (10)

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'échantillons analysés.

nd = non détectable

^aStocké pendant une longue durée à une température élevée; ^bmédiane; ^cfromage à la crème; ^dfromage à pâte dure arrivé à maturité.

vingt échantillons de fromage fondu des teneurs de 15 à 421 mg/kg de protéines. L'utilisation de caséine présure de même que de protéines lactiques lors de la fabrication ne semble pas influencer la concentration de LAL dans le produit final. Les auteurs ont en outre effectué des analyses approfondies sur la présence de LAL dans la mozzarella. Ils ont déterminé dans douze échantillons d'imitation de mozzarella, fabriquée habituellement avec de la caséine présure et des caséinates, une concentration de LAL de 15 à 329 mg/kg de protéines, comparée aux trente échantillons de mozzarella naturelle (0,6 à 3,8 mg/kg de protéines). La haute teneur déterminée dans les imitations de mozzarella pourrait être due à l'utilisation de caséine présure (n = 9) et de caséinate de calcium (n = 5), qui contenaient respectivement 21 à 178 et 128 à 2992 mg de LAL/kg de protéines.

Détection plus fréquente de LAL dans les poudres de lait et les concentrats de protéines

Dans les produits laitiers séchés, la situation est différente. Aucune présence de LAL n'a été détectée dans les quatre poudres de caséinate analysées ni dans l'échantillon de lait écrémé en poudre prélevés dans le commerce. Ces caséinates ont été probablement hydrolysés

par des sels de carbonate et de citrate ou par un ajout prudent et progressif de soude caustique avec un contrôle constant du pH (valeur < 8). Par contre, huit des treize échantillons de poudre de lait spécial possédaient une teneur en LAL élevée de 68 à 712 mg/kg de produit, soit 152 à 881 mg/kg de protéines. Dans deux échantillons de poudre de lait entier, une concentration de LAL de plus de 200 mg/kg de produit, soit environ 1000 mg/kg de protéines, a même été déterminée. Dans deux échantillons de poudre de lait avec des protéines lactiques dénaturées, probablement par hydrolyse alcaline partielle, cette proportion était encore plus élevée. Par ailleurs, seize des dix-sept échantillons d'aliments pour enfants en poudre se caractérisaient par une concentration en LAL élevée (tabl. 4). La grande plage de fluctuation des teneurs en LAL dans le lait et les produits laitiers et en particulier dans les laits en poudre est due en premier lieu aux différentes charges thermiques et durées de chauffage appliquées pendant la fabrication.

Il a déjà été démontré à plusieurs reprises que les concentrats de protéines, en particulier séchés – et dans une moindre mesure les produits laitiers séchés –, peuvent avoir une teneur en LAL élevée (tabl. 3). L'intensité du traitement thermique de même que la valeur pH du milieu aqueux sont déterminantes dans la formation de la LAL. Si la caséine acide était chauffée à 90 °C en

Tableau 4. Présence de LAL dans différents laits en poudre (analyses d'ALP).

Produit	n	pos.	Teneur en LAL (mg/kg de produit)	Teneur en LAL (mg/kg de protéines)
Lait écrémé en poudre	1	0	nd	nd
Lait entier en poudre (séché par atomisation)	3	2	9, 15	34, 60
Lait entier en poudre (séché sur cylindres)	6	4	9, 14, 222, 252	37, 55, 963, 1123
Protéines lactiques en poudre (lait spécial en poudre)	8	4	105, 193, 270, 368	148, 248, 345, 438
Protéines de petit-lait en poudre (lait spécial en poudre)	5	4	68, 100, 246, 712	152, 123, 316, 881
Lait en poudre avec des protéines lactiques hydrolysées	2	2	531, 1949	613, 2296
Caséinate (Na, Ca, K)	4	0	nd	nd
Aliments pour enfants en poudre	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

nd = non détectable; limite de détection: 10 mg/kg de produit. pos = positif.
 1Teneur en protéines inconnue.

présence d'un pH de 10, la concentration en LAL augmentait continuellement pendant douze heures. Holstein (1980) a observé, en particulier dans le domaine alcalin, une forte augmentation de la concentration de LAL. Fritsch (1984) a déjà mentionné à ce propos que lors de la fabrication des caséinates, les milieux alcalins comme la soude caustique doivent être dosés très exactement, ajoutés progressivement et le pH contrôlé. De même, la température d'hydrolyse doit être maintenue au-dessous de 95 °C.

Conclusions

- ❑ La LAL est un composant des denrées alimentaires protéiniques qui ont été soumises à une transformation. Il s'agit d'un produit secondaire indésirable.
- ❑ Dans l'assurance qualité, il peut servir de paramètre pour déterminer les méthodes de transformation utilisées. Avec des méthodes de transformation ménageant le produit de base, la concentration en LAL dans le produit fini peut être maintenue à un niveau bas.
- ❑ Parmi les différents produits laitiers, les concentrats de protéines séchés en particulier ont souvent des teneurs en LAL élevées. Les conditions des traitements thermiques mis en application de même que la valeur du pH lors de la production des protéines lactiques sont déterminantes dans la formation de LAL.

Bibliographie

- 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. N^ε-(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. & Hagemester H., 2000. Protein-bound D-amino acids, and to a lesser extent lysinoalanine, decrease true ileal protein digestibility in minipigs as determined with ¹⁵N-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.
- 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 derivatization with dansyl chloride. *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 milchweiss-haltigen Lebensmitteln. *Dt. Milchwirt.* **35**, 1932-1935.
- Fritsch R. J. & Klostermeyer H., 1981. Bestandsaufnahme zum Vorkommen von Lysinoalanin in milchweiss-haltigen 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^ε- and N^π-(2'-amino-2'-carboxy-ethyl)-L-histidine («histidinoalanine», HAL) in heated milk products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **197**, 114-117.
- Holstein A. B., 1979. Modelluntersuchungen über die Bildung von Lysinoalanin bei Hitzebehandlung von Proteinen. Diss. Univ. München, 79 p.
- 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., de Noni 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-Rädcker 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.

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 quite 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, but 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 there is a high proportion of LAL in the sample, it means that the milk or the dairy product was exposed to too high temperatures at the time of treatment or treated during a too long period. The large fluctuation of the LAL contents in milk and dairy products is mainly due to different heat loads and duration of heating.

Key words: lysinoalanine, milk, dairy product, analytics.

Riassunto

Presenza di lisinoalanina nel latte e nei latticini

La lisinoalanina (LAL) è un derivato indesiderabile che si forma durante il trattamento alcalino delle proteine o il riscaldamento di derrate alimentari contenenti proteine. A causa della loro vicinanza, la deidroalanina reagisce con l' ϵ -amino gruppo della lisina. Il legame è praticamente irreversibile e pertanto la valorizzazione della lisina è quasi completamente, se non totalmente, bloccata. Grazie alla messa a punto di un metodo d'analisi, è stato possibile determinare il tenore di LAL del latte e di diversi latticini in commercio. In genere, i prodotti UHT (latte drink, panna intera, panna per caffè e latte condensato) analizzati da ALP non contenevano tracce di LAL. Solo un campione di panna per caffè UHT ha mostrato un tenore elevato. Inoltre, il processo di caseificazione non induceva alcuna formazione significativa di LAL, assente nei caseinati analizzati. Al contrario, alcuni tipi di latte in polvere e di alimenti in polvere per l'infanzia presentavano, talvolta, alte concentrazioni di LAL. I campioni di latte in polvere con proteine del latte idrolizzato ne contenevano fino a 2296 mg/kg di proteine. La LAL è utilizzata come indicatore nell'assicurazione della qualità nelle derrate alimentari. Se se ne registra una concentrazione elevata in un campione, ciò significa che questo latte o latticino è stato esposto a temperature troppo elevate o troppo a lungo durante il trattamento termico. L'ampia variazione dei tenori di LAL nel latte e nei latticini proviene in primo luogo dalle differenti cariche termiche e degli tempi di riscaldamento.

Zusammenfassung

Vorkommen von Lysinoalanin in Milch und Milchprodukten

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 Analysemethoden wurden Milch sowie diverse Milchprodukte aus dem Handel auf den LAL-Gehalt untersucht. Die an ALP untersuchten UHT-Produkte (Milchdrink, Vollrahm, Kaffeerahm und Kondensmilch) enthielten in der Regel kein LAL, lediglich 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.