

Zur Frage der Aminosäureisomerisierung im Mikrowellenfeld Ergebnisse eines Modellversuches mit Standardlösungen

P. Fritz, L.I. Dehne, J. Zagon und K.W. Bögl

Institut für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, Berlin

The question of amino acid isomerization in a microwave field Results of experiments with standard solutions

Zusammenfassung: In wäßrigen Modell-Lösungen von L-Alanin, L-Glutaminsäure und L-Prolin läßt sich nach einer halben Stunde Sieden auf der Herdplatte im Vergleich mit einer zeitgleichen Hitzebehandlung im haushaltsüblichen Mikrowellenofen keine Zunahme an D-Enantiomeren nachweisen. Ein spezifischer ‚Mikrowelleneffekt‘ und somit ein spezielles Verbraucherrisiko, wie kürzlich postuliert, ist nicht nachweisbar. In konventionell erhitzten Proben beobachtete Effekte auf die Aminosäuren werden als Auswirkung der höheren Wärmebelastung während der Behandlung dieser Proben interpretiert.

Summary: Aqueous standard-solutions of L-alanine, L-glutamic acid, and L-proline do not reveal any increase of D-enantiomers after 30 min heating – neither by the conventional method on a hotplate, nor in a standard microwave oven. A specific “microwave effect” and, hence, a special consumer risk is, in contrast to recent assumptions, not detectable. Effects on the amino acids which were observed in conventionally heated samples are explained by higher heat-exposure during the treatment of these samples.

Schlüsselwörter: D-Aminosäuren – Isomerisierung – Mikrowellen – konventionelles Erhitzen

Key words: D-amino acids; isomerization; microwaves; conventional heating

Einleitung

Können durch Erhitzen von Nahrungsmitteln im Mikrowellenherd D-Aminosäuren entstehen? Diese Frage wurde anlässlich einer im Dezember 1989 erschienenen Kurzmitteilung im Lancet (5), in welcher über Isomerisierungen der Aminosäuren Prolin und trans-Hydroxyprolin in erhitzter Milch berichtet wird, zur Diskussion gestellt. In mikrowellenerhitzter, nicht aber in konventionell auf 80 °C (10 min) erhitzter Milch, wurden geringe Konzentrationen an D-Prolin bzw. cis-Hydroxyprolin nachgewiesen, wobei allerdings genauere Angaben zur Methodik des Erhitzens und Nachweises fehlen. Die Ergebnisse hielten einer Überprüfung durch eine andere Arbeitsgruppe nicht stand (4). Eine zehnminütige Erwärmung von Milch im Ölbad (80 °C) und im Mikrowellenherd (80, 95 °C) erbrachte keine Bestätigung einer mikrowellenspezifischen Razemisierung der freien oder gebundenen Aminosäuren. Die Milch wurde in dem Experiment in einem Hohlleiter mit bekannter Feldverteilung erhitzt, um bei möglichst gleichmäßiger Energieverteilung und Erwärmung eine bessere Vergleichbarkeit mit der konventionellen Erhitzungskinetik zu erreichen.

In Ergänzung zu den vorliegenden Beobachtungen sollte anhand einfacher Modellsysteme geklärt werden, ob im haushaltsüblichen Mikrowellenherd mit inhomogener Feldverteilung im Vergleich zum Erhitzen auf der Herdplatte unterschiedliche Razemisierungstendenzen der freien Aminosäuren unter definierten Erhitzungsbedingungen bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen nachweisbar sind. Die Aminosäure-Modellösungen sind gegenüber der komplexen Matrix des Milchplasmas leichter trennbar. Die dabei eingesetzten hohen Konzentrationen sollen verhindern, daß geringe Razematbildung übersehen wird. Freie Aminosäuren sind nur in geringem Anteil von 0,015–0,05 % gegenüber 9–10 % proteingebundenen Aminosäuren in Milch präsent, wobei die Aminosäuren Alanin, Asparagin- und Glutaminsäure überwiegen (3). Die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen an Alanin bzw. Glutaminsäure liegen ca. 500 bzw. 50 mal über den in Rohmilch natürlicherweise vorkommenden Mengen in der Fraktion der freien Aminosäuren. Die Aminosäuren wurden zudem einer möglichst drastischen Wärmebehandlung unterworfen, die zwar bei der Milcherhitzung im Haushalt nicht üblich ist, aber eventuelle Veränderungen an den Aminosäuren besser sichtbar werden läßt.

Auf die Grundlagen der Mikrowellenerhitzung von Lebensmitteln wurde an anderer Stelle ausführlich eingegangen (8, 9).

Material und Methoden

L-Alanin (18,3 mg), L-Glutaminsäure (10,1 mg) und L-Prolin (14,4 mg) (Aminosäurekit Serva) wurden in jeweils 50 ml chromatographiereinem Wasser (LiChrosolv/Merck) inklusive Aufheizphase 30 min auf dem Herd bzw. im Mikrowellenherd (Philips AVM 742) bei Leistungsstufe 2 (110 Watt) gesiedet. Die Erhitzung erfolgte in 100 ml Erlenmeyer-Weithalskolben. Die maximale Temperatur am Gefäßboden lag beim Sieden auf der Herdplatte zwischen 102 und 104 °C, (durchschnittlich 100 °C), beim Sieden im Mikrowellenherd bei 100 °C (durchschnittlich 98 °C). Die Temperatur wurde mit Hilfe faseroptischer Temperaturfühler (Takaoka) gemessen.

Die Proben (Injektionsvolumen 20 µl) wurden an einer LiChrospher 100 RP18 Säule (Knauer; Korngröße 5 µm) mit Hilfe eines chiralen Eluenten (1 mM Kupferacetat, 2 mM N,N-Dimethyl-L-phenylalanin, pH 4,5) bei Raumtemperatur und einem Fluß von 2 ml/min aufgetrennt. Die Säule wurde vor Gebrauch zwei Stunden mit dem Eluenten konditioniert. Die Detektion erfolgte über einen UV-Detektor (SPD-6A, Shimadzu) bei 254 nm. Die Sensitivität der Aufzeichnung beträgt in Abb. 1 und 2 1 mV/Skalenbreite (größte Empfindlichkeit), bei Abb. 3 handelt es sich um eine Ausschnittsvergrößerung.

Zudem wurden nichterhitzte D- und L-Formen sowie die jeweiligen DL-Gemische hergestellt und chromatographiert.

Ergebnisse und Diskussionen

Nichterhitzte Standardlösungen der einzelnen D- und L-Aminosäuren werden unter den gewählten Chromatographiebedingungen ausreichend getrennt, wobei das D-Enantiomer im Chromatogramm immer vor dem L-Enantiomer erscheint. Die Retentionszeiten unterliegen jedoch in Abhängigkeit von der injizierten Konzentration der Aminosäurelösungen und der Betriebsdauer der Säule Schwankungen. Die im Versuchszeitraum ermittelten minimalen und maximalen Retentionszeiten für die Standardlösungen sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Bei maximaler Verstärkung der Aufzeichnung zeigen sich bereits bei der reinen, ausschließlich in Wasser gelösten und nicht hitzebehandelten L-Alaninprobe mehrere nicht identifizierbare kleine aber reproduzierbare Peaks, die auf Spuren von Verunreinigungen der Alanin-Charge hinweisen, wobei ein Peak, welcher

gemäß Eichgerade ca. 2,6 % der injizierten L-Alanin-Konzentration ausmacht, der Retention von D-Alanin entspricht (Abb. 1). Ebenso im Retentionsbereich der D-Form erscheinen Fremdpeaks in Chromatogrammen des unbehandelten L-Glutaminsäurestandards, während die L-Prolinlösung nicht durch das D-Enantiomer kontaminiert war (ohne Abbildungen). Die Präsenz von D-Aminosäureverunreinigungen in konzentrierten Standardlösungen ist nicht ungewöhnlich. Eine Untersuchung von als reine L-Präparate deklarierten Aminosäuren führte zum Nachweis der D-Aminosäure in allen fünf kommerziellen Proben (1), wobei abhängig von Hersteller und Aminosäuretyp im Extremfall eine D-Form-Kontamination bis zu 3 % festgestellt wurde.

Tab. 1. Retentionszeiten von D,L-Alanin, D,L-Glutaminsäure und D,L-Prolin¹⁾

Aminosäure	Retentionszeiten (min)
D-Alanin	1,75–2,35
L-Alanin	2,12–2,20
D-Glutaminsäure	3,55–3,93
L-Glutaminsäure	4,33–5,17
D-Prolin	2,33–2,83
L-Prolin	5,48–6,33

¹⁾ Eluent: 1 mM CuAcetat, 2 mM N,N-Dimethylphenylalanin
Säule: Lichrospher 100 RP18, Korngröße 5 μ ; Flow: 2 ml/min
Detektion: 254 nm

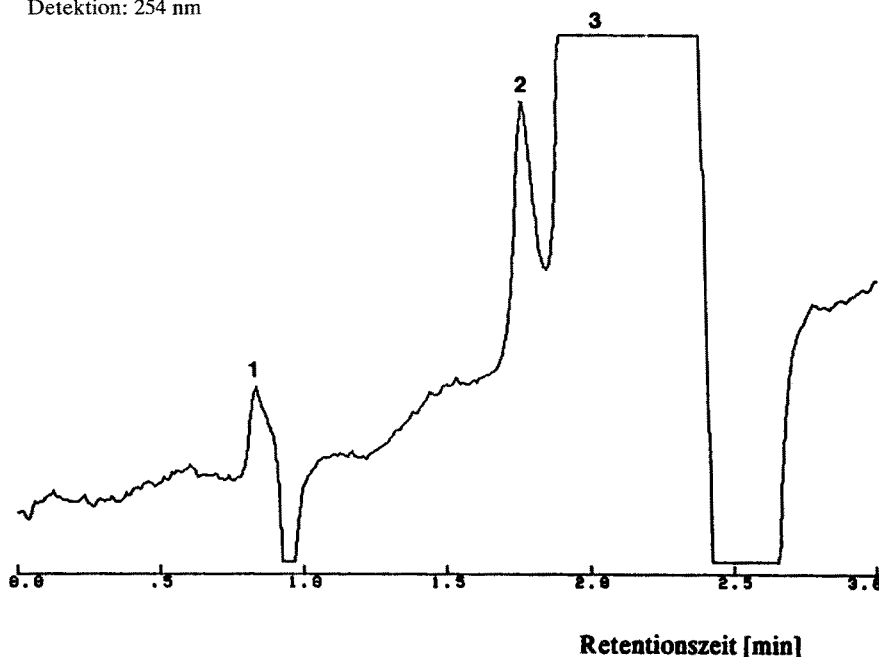


Abb. 1: Standardchromatogramm von L-Alanin bei maximaler Verstärkung (Peak 1: Lösungsmittelpeak, Peak 2: D-Alanin, Peak 3: L-Alanin)

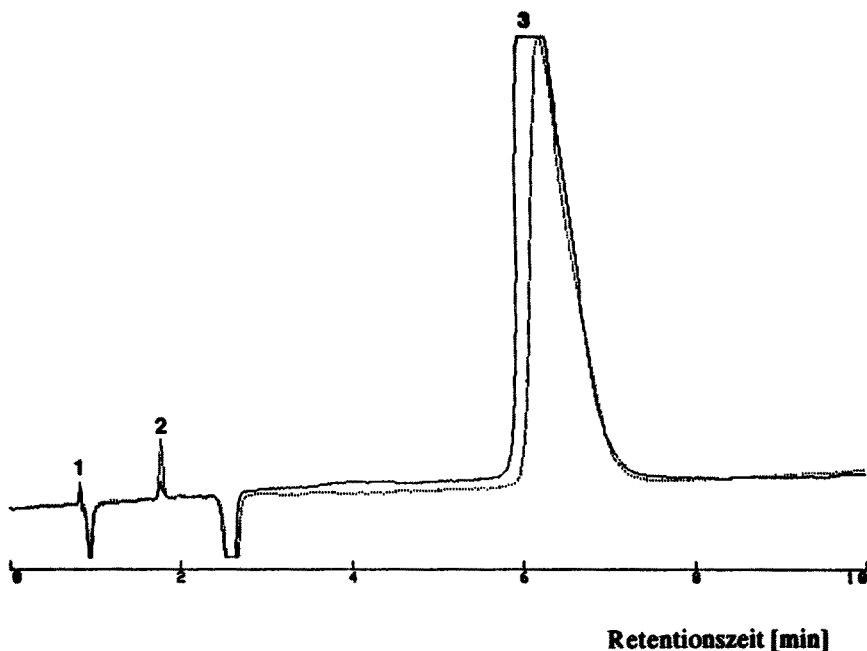


Abb. 2: L-Prolin nach halbstündiger Erhitzung im Mikrowellenherd (durchgezogene Linie) und auf dem Herd (gepunktete Linie) bei maximaler Verstärkung (Peak 1: Lösungsmittelpeak, Peak 2: neu entstandene, nicht identifizierte Verbindung, Peak 3: L-Prolin)

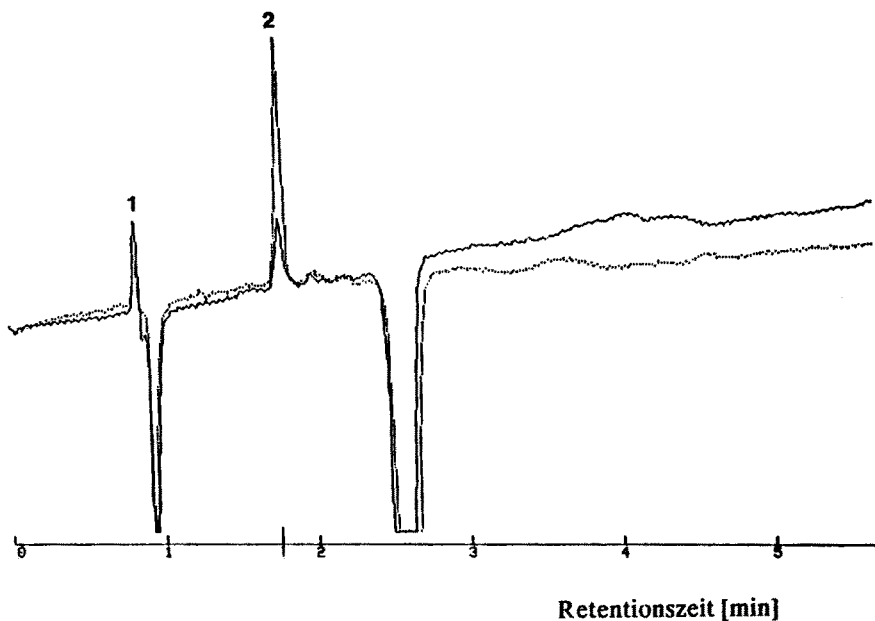


Abb. 3: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 2 (Peak 1: Lösungsmittelpeak, Peak 2: neu entstandenen, nicht identifizierte Verbindung)

Vergleichschromatogramme der Aminosäurelösungen nach konventioneller und Mikrowellenbehandlung lassen bei mäßiger Verstärkung kaum Differenzen zu den Chromatogrammen der nichtbehandelten Kontrollen erkennen. Bei größerer Verstärkung heben sich bei allen Aminosäuren nach dem Erhitzen sehr kleine Peaks hervor, hier beispielhaft im Bereich niedriger Retention an L-Prolin gezeigt (Abb. 2). Neu entstanden ist ein Peak bei einer Retentionszeit von 1,74 min, wobei es sich nicht um D-Prolin handeln kann (vgl. Tab. 1). Die Ausschnittsvergrößerung in Abb. 3 läßt erkennen, daß dieser Peak nach konventioneller Erhitzung größer ist als nach Mikrowellenerhitzung. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den Erhitzungsverfahren jedoch als sehr gering zu beurteilen, wobei noch zu berücksichtigen ist, daß bei den äußerst kleinen, zum Teil bereits an der Nachweisgrenze des verwendeten Chromatographiesystems liegenden Peaks, die Reproduzierbarkeit schlecht und eine genauere Identifizierung beeinträchtigt ist.

Die hier präsentierten Ergebnisse stehen sowohl mit theoretischen Überlegungen als auch neueren experimentellen Befunden zur Aminosäurerazemisierung in erhitzten Lebensmitteln im Einklang (2, 6, 7). Wenn in Chromatogrammen nach konventioneller Erhitzung in einigen Fällen geringfügige Veränderungen auffälliger wurden als nach der Mikrowellenbehandlung, könnte dies an der höheren durchschnittlichen Temperatur der konventionell behandelten Proben liegen. Während die Flüssigkeit in einem hinreichend hohen Gefäß auf der Herdplatte permanent siedet und auf dem Gefäßboden durchschnittliche Temperaturen von ca. 100 °C, maximal 102–104 °C bestimmt wurden, ist eine derartige Behandlung im Mikrowellenherd nur bei schwacher Leistungsstufe möglich, wenn Überkochen vermieden werden soll. Beim Mikrowellenofen erfolgt die Energieabgabe gepulst, was bedeutet, daß die Temperatur während der Versuchsdauer zyklisch geringfügig ansteigt und abfällt. Die durchschnittliche Temperatur betrug bei Aminosäurelösungen im Mikrowellenofen 98 °C. Maximal wurden 100–101 °C erreicht. Die nach Herderhitzen hinzukommenden Peaks im Chromatogramm der Aminosäurelösungen könnten somit als Auswirkung einer zwar geringen aber signifikant höheren thermischen Belastung interpretiert werden.

Die Versuche wurden in Anlehnung an die Verhältnisse im Lebensmittel Milch (pH = 6,8) um den neutralen pH-Wert ($\leq 7,5$) durchgeführt. Beim Erhitzen in alkalischem Milieu könnte es bezüglich des D,L-Aminosäureprofils durchaus zu abweichenden Ergebnissen kommen, da die Razemisierungstendenz von Aminosäuren mit Ansteigen des pH-Wertes generell zunimmt. Ebenso sind in komplex zusammengesetzten Lebensmitteln Matrixeffekte nicht auszuschließen, die in den hier vorgestellten Modellversuchen nicht berücksichtigt werden.

Schlußbetrachtung

Halbstündiges Sieden der Aminosäuren L-Alanin, L-Glutaminsäure und L-Prolin in Wasser hat unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen keine nachweisliche Zunahme der D-Enantiomere zur Folge. Ein spezifischer ‚Mikrowelleneffekt‘ ist nicht erkennbar. Maximaltemperaturen von 102–104 °C reichen unter normalen Kochbedingungen unter Atmosphärendruck bei neutralem bis schwach basischem pH-Wert (7–7,5) demnach nicht aus, um signifikante Isomerisierungsreaktionen an den verwendeten Aminosäuren, auch nicht an Prolin, auszulösen. Die Ergebnisse sollten durch eine zweite Methode verifiziert werden.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß D-Aminosäuren in vielen fermentierten Lebensmitteln auftreten und auch in Spuren natürlicher Bestandteil von Milch sind. In Rohmilch wurden D-Asparaginsäure (17–38 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$), D-Glutaminsäure (7–19 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) und D-Alanin (3–12 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) zweifelsfrei nachgewiesen (3). Diese geringen natürlichen Konzentrationen gelangen z.B. bei Alanin mit ca. 3–12 ppm an die untere Nachweisgrenze des hier verwendeten Chromatographiesystems (ca. 4 ppm für D-Alanin), so daß auf weiterführende Experimente mit Milchisolaten auf Basis des hier verwendeten Systems verzichtet wurde.

Literatur

1. Armstrong DW, Duncan JD, Lee SH (1991) Evaluation of D-amino acid levels in human urine and in commercial L-amino acids samples. *Amino Acids* 1:97–106
2. Bögl KW (1990) Stellungnahme des BGA: Zur Frage einer möglichen Gesundheitsgefährdung durch den Verzehr mikrowellen-erhitzter Milch. *Bundesgesundheitsblatt* 33:342–343
3. Brückner H, Hausch M (1990) D-amino acids in dairy products: Detection, origin and nutritional aspects. I. Milk, fermented milk, fresh cheese and acid curd cheese. *Milchwissenschaft* 45:357–360
4. Dossena A, Marchelli R, Palla G (1991) Occurrence of D-amino acids in foods. 2nd Intern. Congr. on amino acids and analogues, Vienna, August 5–9th, 1991
5. Lubec G, Wolf Chr, Bartosch S (1989) Amino acid isomerisation and microwave exposure. *Lancet* Nr. 9:1392–1393
6. Zagon J, Dehne LI, Bögl KW (1991) Isomerisierung von Aminosäuren in Lebensmitteln. Teil I: Mechanismus und Verbreitung der Aminosäure-Isomerisierung in Organismen und Lebensmitteln. *Ernährungs-Umschau* 38:275–278
7. Zagon J, Dehne LI, Bögl KW (1991) Isomerisierung von Aminosäuren in Lebensmitteln. Teil II: D-Aminosäuren in Lebensmitteln und ihre physiologischen Eigenschaften. *Ernährungs-Umschau* 38:324–328
8. Ohlsson T (1983) Einige Grundzusammenhänge für die Mikrowellenanwendung bei Lebensmitteln. *Ernährungs-Umschau* 30:180–185
9. Decareau RV, Peterson RA (1986) Microwave processing and engineering. Ellis Horwood Ltd, Chichester/GB and VCH, Weinheim

Eingegangen 27. April 1992
akzeptiert 27. Juni 1992

Für die Verfasser:

P. Fritz, Inst. f. Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, General-Pape-Straße 62–66, 1000 Berlin 42