

ÉLELMISZEREK D-AMINOSAV TARTALMA

*Csapó János – Csapóné Kiss Zsuzsanna – Kametler László – Pohn Gabriella –
Vargáné Visi Éva*

Pannon Agrártudományi Egyetem, Kaposvár

Összefoglalás

Az élelmiszer fehérjékben előforduló D-aminosavak a technológiai beavatkozás következtében jönnek létre, miközben előkészítik az alapanyagokat fogyasztásra. A D-aminosavak legfontosabb forrásai az élelmiszerek, ugyanis az élelmiszer fehérjék a főzés vagy a különböző élelmiszeripari feldolgozási folyamatok során kisebb-nagyobb mértékű racemizáción esnek át. Az élelmiszer áruházak növekvő mennyiségben tartalmaznak olyan élelmiszereket (reggelihez használt cereáliák, sült krumpli, folyékony és poralakú gyermektápszerek, húshelyettesítők és egyéb kiegészítő szerek) melyek egy része jelentős mennyiségű D-aminosavat tartalmaz, és ezek a D-aminosavak káros emésztési és egészségügyi sajátságokkal bírnak. A lúgos kezelés katalizálja az optikailag aktív aminosavak racemizációját. A racemizáció aránya eltérő ugyan a különböző fehérjéknél, de a fehérjéken belül az egyes aminosavak relatív sorrendje igen hasonló. Elsősorban a közeg pH-ja, a hőkezelés, az alkalikus behatás ideje és az egyes aminosavak szerkezete befolyásolja leginkább a racemizációt. Az alkáliával vagy a hővel történő kezelés során kapott D-aminosavak rontják a minőséget és a kezelt élelmiszer biztonságos felhasználhatóságát. A D-aminosavak jelenléte a fehérjében csökkenti az emészthetőséget és a többi aminosav hozzáférhetőségét. Ez az esszenciális aminosavak L-enantiomerjei mennyiségének csökkenését eredményezheti, mivel a peptid kötések a normális úton nem tudnak széthasadni. Néhány D-aminosav izomer toxikus hatással is rendelkezhet és módosíthatják a lizinoalanin biológiai hatását is.

Bevezetés

Az élelmiszerek nagy mennyiségben tartalmaznak olyan idegen eredetű, nem természetes anyagokat, melyek nagymértékben befolyásolhatják annak emészthetőségét. Ilyenek például a D-sztereoizomer aminosavak, melyek a közönséges L-sztereoizomer aminosavakból képződnek; vagy az előállítás folyamán, vagy az élelmiszer mikrobiológiai minőségében beállt változás következtében. Jelenlétük csökkenti az élelmiszerfehérje emészthetőségét és az átalakult aminosav felhasználhatóságát. Annak ellenére, hogy a D-aminosavakat általában nem tartják kívánatosnak az élelmiszerekben, többen azon a véleményen vannak, hogy a D-aminosavak némely esetben még előnyösek is lehetnek az emberi szervezet számára.

Pasteur a bükkyből előállított aszparaginsavról kimutatta, hogy az optikailag aktív (királis), ezzel szemben az ammonium-fumarát hevítésével előállított aszparaginsav nem mutat optikai aktivitást. Ezt követően rájöttek arra, hogy az élő szervezet fehérjéit kizárólag L-aminosavak építik fel annak ellenére, hogy a D- és az L-sztereoizomerek (enantiomerek) többnyire azonos kémiai és fizikai tulajdonságokkal rendelkeznek. Szembetűnő különbség azonban, hogy a két sztereoizomer a polarizált fény síkját ellentétes irányban forgatja el. Az élő szervezet fehérjéinek sztereospecifikus szintézisét nem tudták megmagyarázni, s így ez a probléma csaknem egy évszázadon át foglalkoztatta a kutatókat.

Az aminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására kifejlesztett módszerek tökéletesedésével úgy találták, hogy a D-aminosavak - a korábbi felfogással ellentétben - számos élő szervezetben előfordulnak. A baktériumok sejtfa, pontosabban az abban lévő peptidoglikánok, viszonylag nagy mennyiségű D-aszparaginsavat, D-glutaminsavat és D-alanint tartalmaznak, s így ezek meghatározása révén következtetni lehet a bakteriális eredetű fehérje jelenlétére, és a baktériumok által termelt fehérje mennyiségére. Korábban többnyire a diamino-pimelinsavat használták erre a célra, de a vizsgálatokból úgy tűnik, hogy a D-aszparaginsav és a D-glutaminsav is megfelelő markere lehet a bakteriális fehérjeszintézisnek. Ismert tény az is, hogy néhány tengeri féreg és gerinctelen állat sejt folyadék tartalmazhat fő komponensként D-aminosavat, és néhány tengeri kagylóban a D-aminosav mennyisége az 1 %-ot is meghaladhatja, sőt a magasabbrendű növények is tartalmaznak D-aminosavakat. A hosszú élettartamú emlősök metabolikusan stabil fehérjéi szintén nagyobb mennyiségben tartalmaznak racemizációból származó D-aszparaginsavat; az emberi agy fehér állományának D-aszparaginsav koncentrációja eléri a 3, a gerincvelő tisztított bázikus fehérjéje pedig a 10 %-ot. Bizonyították, hogy az aszparaginsav *in vivo* racemizálódik az emberi szövetekben, bár a gyors anyagforgalom miatt nem akkumulálódik számottevő mennyiségben.

A királis aminosavak átalakulhatnak racém keverékké, mely átalakulás reakciómechanizmusa feltételezi az α -helyzetű szénatom hidrogénjének leszakadását, a planáris karbanion szerkezet kialakulását. A racemizáció aránya függ attól, hogy az aminosav szabadon vagy a peptidláncban kötött formában fordul elő, és természetesen leginkább függ a hőmérséklettől és a pH-tól, és az aminosavban előforduló R csoport tulajdonságától. Táplálkozási szempontból az esszenciális aminosavak racemizációjának van a legnagyobb jelentősége. Az esszenciális aminosavak D-enantiomerjeinek emészthetőségét és metabolizmusát már régóta vizsgálják. Korábbi tanulmányokból kitűnik, hogy az emlősökben az esszenciális aminosavak D-enantiomerjei igen gyengén hasznosulnak, néhány esetben növekedési inhibitoroként hatnak, és főként a vizelettel ürülnek ki. Az esszenciális aminosavak racemizációs felezési idejét csak a legutóbbi időkben vizsgálták. Mérési adatok alapján úgy tűnik, hogy a cisztein különösen hajlamos a racemizációra, míg az alifás oldalláncú aminosavak a legstabilabbak e tekintetben. A legtöbb esszenciális aminosav racemizációs felezési ideje hosszabb, mint az aszparaginsavé.

A lúgos kezelésnek vagy hosszabb ideig hőnek kitett élelmiszerfehérjék nagyobb koncentrációban tartalmaznak racemizációból eredő aminosavakat. Nyilvánvaló, hogy az emészthetőség csökkenése összefüggésben van a lizinoalanin keletkezésével és a fellépő racemizációval.

Élelmezési eredetű D-aminosavak

Mint hogy a rovarok, férgek és tengeri gerinctelenek általában nem, illetve csak csekély szerepet játszanak az emberi táplálkozásban, nincs különösebb jelentősége annak, hogy ezek szervezete meglehetősen nagy mennyiségű D-aminosavat tartalmaz. Ha azonban a táplálkozási szokások közé a gyakori kagylófogyasztás is beletartozik, a fokozott D-aminosav fogyasztással együtt járó, kedvezőtlen élettani hatásokkal is számolni kell.

A technológiai és konyhai élelmiszer-feldolgozás többsége hőkezeléssel (gőzölés, főzés, sütés), esetenként pedig lúgos behatással jár. Mindezek racemizációt indukálhatnak a fehérjében. Többen kimutatták, hogy néhány technológiai behatásnak alávetett, kereskedelmi forgalomban kapható élelmiszerben nagyobb mennyiségű D-aminosav található, és a lizinoalanin szinte mindenütt jelen van az élelmi anyagokban. Ráadásul az olyan szintetikus előállított termékek, mint az aszpartám dipeptid különösen hajlamosak a racemizációra. Saját vizsgálataink szerint (1. táblázat) a lúgos hidrolízissel előállított toll-liszt aminosavainak 10-40%-a racemizálódik az előállítási paraméterek függvényében.

1. táblázat

A lúggal feltárt toll-liszt D-aminosav tartalma

Aminosav	Összes aminosav	Fél órás főzés	Egy órás főzés
		1 M nátriumhidroxidban % D-aminosav	
Asp	6,187	31	44
Thr	3,98	19	27
Ser	9,16	22	31
Glu	8,51	17	23
Pro	10,74	?	?
Gly	5,74	-	-
Ala	4,14	10	14
Cys	6,38	24	34
Val	5,61	3	4
Met	0,40	17	24
Ile	3,72	6	8
Leu	6,80	5	7
Tyr	2,72	17	24
Phe	4,09	14	20
Lys	0,89	16	22
His	0,57	29	41
Arg	5,37	?	?
Trp	0,23	?	?

A tej, a hús és a gabonafélék - melyek természetes állapotukban nem tartalmaznak jelentős mennyiségben D-aminosavakat - a fogyasztásra történő előkészítés folyamán gyakran vannak olyan körülményeknek kitéve, melyek racemizációt okozhatnak. A tej és tejtermékek a legjobb példa arra, hogyan változhat meg a természetes anyag összetétele a technológiai műveletek során. Bár az élelmiszer áruházak egy részében kezeletlen (nyers) tej is kapható, a legtöbb tejterméket először pasztörözik (hőntartás 30 percig 68-72 °C-on) vagy ultraszűrtörözik (hőntartás 135-145 °C-on 15 másodpercig). Ezt követi aztán a homogénezés, a kondenzálás, és befejezésképpen egy olyan speciális terméket kapunk, mint a fogyasztási tej, a joghurt vagy a különböző tejfehérje frakciókból kapott sajt. Ez utóbbi két tejterméket baktériumok segítségével fermentálják, ami ugyancsak forrása a D-aminosavaknak. Egy kísérletben a kezeletlen nyers tej tartalmazta a legkevesebb D-aszparaginsavat (1.48%), a kezelések növekvő

számával pedig nőtt mennyisége (acidofil tej: 2.05%, zsírtalanított tejpor: 2.15%, kefir: 2.44%, sűrített tej: 2.49%, joghurt: 3.12%, tejalapú csecsemőtápszer: 4.95%). Azok a termékek tehát, amelyek előállításához szükséges a melegítés akár 5% D-aszparaginsav tartalmúak is lehetnek. Legnagyobb a D-aszparaginsav aránya a csecsemőtápszerekben, melyek olyan technológiai beavatkozásokon mennek keresztül, mint pl. a porlasztva szárítás vagy a hővel való sterilizálás.

A hőkezelés és a baktériumok hatását vizsgálva a tej szabad és fehérjében kötött D-aminosav tartalmára megállapították, hogy a nyers tej szabad D-aminosav tartalma nem nőtt a pasztörözés, az ultrapasztörözés vagy a sterilizálás hatására. A vizsgált tejminták szabad D-alanin tartalmát 3-8% közöttinek, D-aszparaginsav tartalmát 2-5% közöttinek, D-glutaminsav tartalmát pedig 2-4% közöttinek mérték. Ezzel szemben megállapították, hogy a nyerstej-minták szabad D-aminosav tartalma jelentősen nőtt a 4 °C-on történő tárolás alatt, ezért a D-alanin tartalmát a tej bakteriális szennyezettségének ellenőrzésére javasolják felhasználni. A tejfehérjében kimutatott D-aminosav tartalmát a fehérje hidrolízise során bekövetkezett racemizációnak tulajdonítják.

Keresve a választ arra, hogy mi okozza a kereskedelmi forgalomban kapható tej D-aminosav tartalmát, meghatároztuk egészséges tehenek első tejsugarai, első tejsugaraktól mentes elegyteje, valamint a masztiteszt próba különböző fokozatainak megfelelő tejminták szabad D-aminosav tartalmát. Megállapítottuk, hogy mind az első tejsugarak, mind pedig a beteg tögyből származó tej jelentős mennyiségben tartalmaz D-Asp-t, D-Glu-t, D-Ala-t és D-allo-Ile-t. A felsorolt aminosavakon kívül a tögygyulladásos tögyből származó tejből még D-Ser-t, D-Pro-t, D-Val-t, D-Leu-t és D-Lys-t is ki tudtuk mutatni. A D-aminosavak mennyisége és aránya a masztiteszt próba fokozatainak megfelelően nőtt a beteg tögyből származó tejben. Vizsgálataink bizonyították, hogy a kereskedelmi tej D-aminosav tartalma az első tejsugarakból és/vagy a szubklinikai masztitiszben szenvedő tehenek tejéből származik.

Többben a tejpor szabad D-aszparaginsav tartalmát 4-5%, D-alanin tartalmát pedig 8-12% közöttinek találták. A joghurt szabad D-alanin tartalmát 64-68%-nak, szabad D-aszparaginsav tartalmát 20-32%-nak, szabad D-glutaminsav tartalmát pedig 53-56%-nak mérték. Ugyanezek az értékek érett sajt esetében 20-45%, 8-35% és 5-22% között alakultak. Az érett sajt szabad D-fenilalanin tartalmát 2-13% közöttinek találták, és egy minimális mennyiségű D-leucint is ki tudtak mutatni belőle. A pörkölt kávé D-aszparaginsav tartalmát 23-38%, D-glutaminsav tartalmát 32-41%, D-fenilalanin tartalmát pedig 9-12% között találták. Felhívják a figyelmet arra is, hogy nem azok az élelmiszerek tartalmazzak sok D-aminosavat, melyeket hosszabb ideig tartó hőkezelésnek tettek ki, hanem inkább azok, melyek baktériumos fermentáción mentek keresztül.

Ioncserés oszlopkromatográfiával vizsgáltuk az érett ardrahan ír sajt és a camembert sajt fél cm vastag külső rétegének és belső részének, a dán kék-, az ementáli-, a gouda-, a mozzarella-, a parmezán- és a különböző módszerekkel előállított cheddar sajtok szabad összes aminosavtartalmát, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával pedig szabad D-aszparaginsav, D-glutaminsav és D-alanin tartalmát. A 2. táblázatban összefoglalt eredmények szerint a D-Asp, a D-Glu és a D-Ala mennyisége, mind a minta tömegére, mind az összes szabad aminosav mennyiségére vonatkoztatva, igen széles tartományban változott. Ezzel szemben az összes többi D-aminosav koncentrációja szinte egyöntetűen

a kimutathatóság határán volt a vizsgált sajtokban. Kivételt képeztek ebben a tekintetben a különböző cheddar sajtok, melyek gyártásához laktobacilusokat is használtak.

2. táblázat

A különböző sajtok fő D-aminosav tartalma ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Sajtok	D-aminosavak					
	D-Asp	D-Asp %*	D-Glu	D-Glu %*	D-Ala	D-Ala %*
Érett Ardrahan ír sajt*	74	27.2	173	13.1	433	27.1
Érett Ardrahan ír sajt**	70	23.2	235	14.4	393	28.2
Camembert sajt*	42	13.9	122	12.9	334	18.0
Camembert sajt**	36	14.0	176	14.8	259	16.1
Dán kék sajt	89	31.1	149	20.2	212	42.4
Emmentáli	42	26.8	195	26.6	405	45.6
Gouda sajt	61	28.5	244	22.7	462	38.4
Mozzarella	5.2	28.9	9.6	24.0	52	33.3
Parmezán	57	20.8	72	10.6	752	37.3
Kereskedelmi Cheddar	74	46.3	45	14.1	96	45.3

* külső rétege; ** belső része

A különböző technológiai műveleteknek alávetett élelmiszerek

A mai modern élelmiszeripari technológiák különféle eljárások során megváltoztatják a fehérje tulajdonságait azért, hogy javítsák ízét, állagát és eltarthatóságát. Előszeretettel alkalmazzák a hővel és lúggal történő kezelést olyan termékek előállítására, melyek speciális tulajdonsággal, formával és funkcióval rendelkeznek. A szójafehérjét például alkáliákkal és hővel kezelik, hogy olyan rostos szerkezetű terméket kapjanak a extrúzió folyamán, melyet húshelyettesítőként használhatnak. Hogy a kukorica fehérjéből kukoricapelyhet vagy tortillát nyerjenek szintén lúgos kezelést alkalmaznak.

A hó vagy a hővel kombinált alkalikus kezelés minden esetben mérhető mennyiségben produkál D-aminosavat. A legnagyobb D-aszparaginsav tartalma annak a kazeinnek (31%) volt, amelyet 20 percig 230 °C-ra hevítettek fel. A racemizálódott aminosavak összehasonlítása azt mutatja, hogy legnagyobb mértékű a racemizáció az aszparaginsavnál. Általánosságban elmondható, hogy az esszenciális aminosavak nem racemizálódnak gyorsan, csak ha magas hőhatásnak vannak kitéve. A magas hőmérséklet és a lúgos kezelés kombinációja az esszenciális aminosavaknál is jelentős racemizációval járhat.

Más vizsgálatok is a kezelt élelmiszerek nagy D-aminosav tartalmáról tanúskodnak. Néhány kereskedelmi forgalomban kapható élelmiszer D-Asp tartalmát vizsgálva megállapították, hogy a texturált szójafehérjében (9%), a szalonnában (13%) és a nem tej eredetű zsiradékban (17%) igen magas annak koncentrációja. Jelentős mennyiségű D-Asp-t találtak a búzalisztból készült sós kekszben (9.5%), a búzatésztában (11.9%), a mexikói palacsintában (11.6%) és a kukoricamáléban (15.4%). A zsírban sült hamburger adatai viszont azt jelzik, hogy ez esetben a sütés folyamán csak jelentéktelen

mértékű racemizáció megy végbe. Ezzel szemben a fehérkenyérből készült pirítósnál, a sültzalonnánál és a csirkehúsnál kapott magas D-aminosav arány azt jelzi, hogy bizonyos körülmények között a főzés és a sütés nagymértékű racemizációval járhat.

Érdekes és igen időszerű kérdésfeltevés, hogy a mikrohullámú kezelés megváltoztatja-e az élelmiszerfehérjék aminosav-összetételét. Gyermektápszerre vonatkozó adatok arra mutatnak, hogy 10 perces mikrohullámú kezelés hatására megnő a cisz-3- és a cisz-4-hidroxiprolin, továbbá a D-prolin mennyisége. A cisz izomer koncentrációja 1-2 mg/liter volt. Felhívják a figyelmet arra, hogy ha a cisz izomer épül be a fehérjébe a tranz izomer helyett, akkor ez strukturális, funkcionális és immunológiai változásokhoz is vezethet.

Ipari eredetű élelmiszerek és mesterségesen előállított peptidek

E kategóriába tartozik minden olyan élelmiszer, melyet jelentős technológiai kezelésnek vetettek alá, vagy amelyet szintetikusán állítottak elő (pl. aszpartám). Néhány folyékony élelmiszerben a fehérjét szénhidráttal kombinálják, amely során a fehérje jelentős változást szenvedhet. Jelentős D-aminosav tartalommal bírhatnak az antibiotikum peptidek és kemoterápiában használt egyes gyógyszerek is, amelyek maradékai egyébként jelentős D-aminosav tartalmat eredményezhetnek az élelmiszerekben. Megállapítható, hogy a szintetikus termékek lényegesen több aminosavat tartalmaznak mint a természetes alapanyagok, s ezek a fő forrásai lehetnek az élelmiszerek D-aminosav tartalmának. A szójafehérje alapú folyékony tápszer - melyet egyébként az "egészséges élelmiszerek" áruházából szereztek be - 13% D-aszparaginsavat tartalmazott, ami lényegesen több volt annál, mint amit a szója alapú gyermektápszerben találtak. A kereskedelmi forgalomban kapható, fogyasztó hatású tápszerek 50% D-szerint, 37% D-aszparaginsavat és 26% D-fenilalanint tartalmaztak (valószínűleg alkalikus kezelés hatására). Ez a nagymennyiségű D-aminosav jelen esetben különösen veszélyes lehet, mivel egyedüli fehérjeforrásként alkalmazzák. Az ilyen szélsőséges esetek viszonylag ritkák, de azért felhívják a figyelmet arra, hogy az alkáliával és hővel huzamosabb ideig kezelt élelmiszer esetében az aminosavak nagy része racemizáción mehet keresztül.

Az aszpartám édesítőszer racemizációját tanulmányozva beszámoltak arról, hogy mind az aszparaginsav mind a glutaminsav gyorsan racemizálódott neutrális pH-n és 100 °C-on. A racemizáció akkor fordul elő, amikor az édesítőszer ciklikus dipeptiddé alakul át, mely nagyon hajlamos a racemizációra. Azért fontos ezt tudni, mert ha pl. főzés előtt adják az édesítőszert az ételhez, az nagymértékben racemizálódhat.

Következtetések

Az előzőekből világosan kiderül, hogy a D-aminosavak - a természetes élelmiszer-alapanyagok kivételével - szinte minden táplálékunkban, élelmiszerben kisebb nagyobb mennyiségben előfordulnak. Ennek ellenére néhány kutatóhelytől eltekintve, a D-aminosav tartalmat rutinszerűen sehol sem vizsgálják. Az ioncserés oszlopkromatográfián alapuló rutin aminosavanalízissel, vagy a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfián alapuló gyors módszerekkel a D- és L-aminosavakat nem lehet egymástól elválasztani. Ezek alkalmazásával az eredmény ugyanaz lesz, ha olyan fehérjét elemeznek, amely tisztán csak L-aminosavakból épül fel, vagy ha ugyanebben a

fehérjében az aminosavak teljes mértékben racemizálódtak. Pedig micsoda különbség van a két analizált ételiszter között! A látszólagosan azonos aminosav-összetétel ellenére az egyik fehérjéje jó minőségű, a másiké pedig nemcsak hogy szinte teljesen emészthetetlen, de még káros is lehet az egészségre. Mi jelenthet előrelépést ebben a tekintetben? Ma már hazánkban is sok helyütt használnak jó minőségű nagyhatékonyságú folyadékkromatográfokat ill. gázkromatográfokat. Megfelelő módszerfejlesztéssel elérhető, hogy mindkét készülék alkalmas lesz a D- és az L-aminosavak szétválasztására, ill. a D-aminosavak mennyiségének pontos meghatározására. Amilyen nagyhorderejű dolog volt a Kjeldahl féle fehérjemeghatározás bevezetése, majd az ioncserés oszlopkromatográfiás elven működő aminosav analizátorok felhasználása, ezeket követően pedig az aminosav alapon történő ételiszter- és takarmányreceptúrák kidolgozása, véleményünk szerint ugyanolyan nagy lépés lenne az, ha kiváló minőségű ételisztereket tudnánk előállítani az aminosav racemizáció csökkentésével. Jó lenne, ha a kritikusabb ételiszterek nem csak a fehérjetartalom és az aminosavösszetétel, hanem a D-aminosav tartalom alapján is minősítve lennének.

Köszönetnyilvánítás: A szerzők köszönik az OTKA (T-14916) és az MKM (MKM-15) támogatását.

SUMMARY

D-amino acid content of feed

The most important source of D-amino acids in nutritional protein is the processing that some foods undergo, either in cooking or as part of the manufacturing process used to prepare commercial food products. Supermarkets contain increasing quantities of processed food products, including breakfast cereals, fried potato and corn chips, liquid and powdered infant formulas, and meat substitutes. Such products probably contain significant quantities of D-amino acids, coupled with the evidence that these D-amino acids most likely have deleterious or negative nutritional effects. Alkali treatment of proteins catalyses racemization of optically active amino acids. The racemization rates vary among proteins but that, within each protein studied, the relative order is similar. Factors which influence racemization include pH, temperature, time of exposure to alkali, and the inductive nature of amino acid side chains. Protein-bound D-amino acids formed during alkali and heat treatment of food proteins may adversely affect the nutritional quality and safety of processed foods. D-amino acids in dietary proteins reduce the digestibility as well as the availability of the component amino acids. This may be the result of decreased amounts of essential amino acid L-enantiomers, decreased digestibility through peptide bonds not susceptible to normal peptidase cleavage, specific toxicity of certain D-isomers, and/or modification of the biological effects of lysinoalanine or other unnatural amino acids.