

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

**Die Quantifizierung von Aminosäureisomeren in Lebensmitteln  
mittels chiraler Gaschromatographie-Massenspektrometrie  
im Hinblick auf die Relevanz und die Entstehungsmechanismen  
von D-Aminosäuren**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
am Fachbereich 09  
Agrarwissenschaften, Ökotrophologie  
und Umweltmanagement

vorgelegt von  
Dipl.-oec. troph.  
**Thorsten Erbe**  
aus Weinbach

Oktober 1999



---

## LISTE DER ORIGINAL-PUBLIKATIONEN

Diese Dissertation basiert auf folgenden Original-Publikationen:

- [A] ERBE T, BRÜCKNER H (1998) Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography - selected ion monitoring mass spectrometry, *Z Lebensm Unters Forsch* **207**: 400-409
  
- [B] ERBE T, BRÜCKNER H (1999) Microwave treatment of dietary gelatin does not generate *cis*-4-hydroxy-L-proline, an inhibitor of collagen biosynthesis, *Z Lebensm Unters Forsch* **208**: 424-428
  
- [C] ERBE T, BRÜCKNER H (2000) Racemization kinetics of dietary amino acids in vinegar and aqueous acetic acid, *Eur Food Res Technol* **im Druck**
  
- [D] ERBE T, BRÜCKNER H (2000) Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for manufacturing, *J Chromatogr* **im Druck**

In den folgenden Ausführungen wird auf diese Original-Publikationen anhand ihrer Bezeichnungen [A – D] verwiesen.

Die Arbeiten werden, mit freundlicher Genehmigung der entsprechenden Verlage, im Anhang als Originale dargestellt, soweit bei Drucklegung der Dissertation die im Verlagslayout gesetzten Versionen vorlagen.

---

## INHALT

Liste der Original-Publikationen.....	I
Inhalt.....	II
Verzeichnis der Abbildungen.....	V
Verzeichnis der Tabellen.....	VI
Verzeichnis der Abkürzungen.....	VII
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Chiralität als Grundprinzip des Lebens.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Begriffsbestimmungen.....	2
1.1.2 Nomenklatur.....	3
<b>1.2 Vorkommen von D-Aminosäuren.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Vorkommen von D-Aminosäuren in der unbelebten Natur.....	4
1.2.2 Vorkommen von D-Aminosäuren in lebenden Organismen.....	6
1.2.2.1 D-Aminosäuren in prokaryontischen Lebewesen.....	6
1.2.2.2 D-Aminosäuren in eukaryontischen Lebewesen.....	7
1.2.2.2.1 D-Aminosäuren in Pflanzen.....	7
1.2.2.2.2 D-Aminosäuren im Tierreich.....	8
1.2.2.2.3 D-Aminosäuren im menschlichen Organismus.....	9
1.2.2.2.4 D-Aminosäuren in Lebensmitteln.....	11
<b>1.3 Entstehungsmechanismen zur Bildung von D-Aminosäuren.....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Racemisierung peptidgebundener Aminosäuren.....	12
1.3.1.1 Chemisch-physikalisch induzierte Racemisierung.....	14
1.3.1.2 <i>In vivo</i> Racemisierung.....	15
1.3.1.2.1 Funktionelle Strukturen.....	15
1.3.1.2.2 Physiologische Alterungsprozesse und pathophysiologische Phänomene.....	18
1.3.2 Racemisierung freier Aminosäuren.....	19
1.3.2.1 Chemisch-physikalisch induzierte Racemisierung.....	19
1.3.2.2 Mikrobiologisch – enzymatisch induzierte Racemisierung.....	22

---

<b>1.4</b>	<b>Metabolismus und Wirkung von D-Aminosäuren .....</b>	<b>24</b>
<b>1.5</b>	<b>Analytische Methoden zur Bestimmung von D- und L-Aminosäuren .....</b>	<b>28</b>
1.5.1	Klassische Methoden .....	28
1.5.2	Moderne chromatographische Methoden .....	28
1.5.2.1	Gaschromatographische Methoden .....	28
1.5.2.2	Flüssigchromatographische Methoden .....	30
<b>1.6</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1</b>	<b>Instrumentelle Anordnung und Systemeinstellungen.....</b>	<b>32</b>
2.1.1	Gaschromatograph-Massenspektrometer .....	32
2.1.2	Gaschromatograph-Flammenionisationsdetektor .....	34
2.1.3	Gase aus Druckgasflaschen.....	34
2.1.4	Trennsäulen.....	35
<b>2.2</b>	<b>Geräte und Hilfsmittel .....</b>	<b>35</b>
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4</b>	<b>Probenmaterialien .....</b>	<b>35</b>
2.4.1	Probenbehandlung .....	36
2.4.2	Probenaufarbeitung .....	37
<b>2.5</b>	<b>Herstellung von Lösungen und Reagenzien .....</b>	<b>37</b>
<b>2.6</b>	<b>Derivatisierung der Aminosäuren für die Gaschromatographie .....</b>	<b>38</b>
<b>2.7</b>	<b>Mathematische Grundlagen der Auswertung.....</b>	<b>39</b>
2.7.1	Berechnung der relativen und absoluten Aminosäuregehalte .....	39
2.7.2	Statistische Berechnungen .....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Chirale Aminosäurenanalyse von Speiseessigen mittels Gaschromatographie – Massenspektrometrie .....</b>	<b>40</b>

---

<b>3.2</b>	<b>Studien zur optischen Isomerisierung diätetischer Aminosäuren in Essig und wässriger Essigsäure .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Chromatographische Bestimmung von Aminosäurenenantiomeren in Bieren und Bierrohstoffen.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Untersuchung zur möglichen Bildung potenziell toxischer Aminosäuren durch die Mikrowellenbehandlung von Speisegelatine ....</b>	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b>Kritische Beurteilung der Analysenergebnisse.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>Schlußbetrachtung und Ausblick .....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>67</b>

---

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

- Abb. 1-1** L- und D-Glycerinaldehyd in der Fischerprojektion
- Abb. 1-2** Struktur von DL-Alanin bzw. 2-Aminopropansäure
- Abb. 1-3** Spontane Reaktionen, die zur Bildung veränderter Aspartylreste in Polypeptiden führen
- Abb. 1-4** Protonen-katalysierte Enolisierung von Aminosäuren
- Abb. 1-5** Ausbildung einer Protonen-katalysierten konjugierten Dienolstruktur bei Asparaginsäure
- Abb. 1-6** Stabilisierung von Prolin in stark saurer Lösung durch Ausbildung einer exozyklischen Doppelbindung
- Abb. 1-7** Blockierung der Enolisierung des Serin im stark Sauren durch Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke
- Abb. 1-8** Reaktionsmechanismus Pyridoxalphosphat-abhängiger Racemasen

---

## VERZEICHNIS DER TABELLEN

- Tab. 2-1** Charakteristische Massenfragmente ( $m/z$ ) der Pentafluorpropionyl-Derivate der Aminosäure-Enantiomerenpaare mit den zugehörigen Retentionszeiten gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil-L-Val
- Tab. 2-2** Retentionszeiten und charakteristische Massenfragmente ( $m/z$ ) der Trifluoracetyl-Hyp-2-Propylester gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil-L-Val



---

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
AGA	<i>N</i> -Acetylglucosamin
Ala	Alanin
<i>allo</i> -Ile	<i>allo</i> -Isoleucin
AMS	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BHT	Butyl-hydroxy-toluol (2,6-Di- <i>tert.</i> -butyl- <i>p</i> -kresol)
Cys	Cystein
DCM	Dichlormethan
FID	Flammen-Ionisationsdetektor
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GC	Gaschromatograph
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
Hyp	Hydroxyprolin
IBD(L)C	<i>N</i> -Isobutyryl-D(L)-Cystein
i.D.	innerer Durchmesser
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MG	Molekulargewicht

---

MS	Massenspektrometer
Nle	Norleucin
OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
Orn	Ornithin
PFPAA	Pentafluorpropionsäureanhydrid
PFP-	Pentafluorpropionyl
Phe	Phenylalanin
Pip	Pipecolinsäure
Pro	Prolin
PrpOH	Propanol
PVED	Paritätsverletzende Energiedifferenz
Ser	Serin
SIM	Selected Ion Monitoring
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TFA-	Trifluoracetyl-
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

# 1 Einleitung

## 1.1 Chiralität als Grundprinzip des Lebens

Form, Zusammensetzung und Symmetrie der Moleküle spielen in allen biochemischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Im Verlauf der erdgeschichtlichen Evolution entwickelten sich beim Aufbau organischer Strukturen Präferenzen für bestimmte Formen von Molekülen, die aufgrund ihrer dissymmetrischen Eigenschaften optische Aktivität besitzen. Solche Moleküle werden auch als chiral bezeichnet. Zum Aufbau der ribosomal synthetisierten Proteine werden beispielsweise lediglich L-Aminosäuren (L-AS) herangezogen, während zur DNA- und RNA-Synthese ausschließlich Zucker in der D-Konfiguration dienen. Für diese selektive Enantiomerenpräferenz gibt es Vielzahl teilweise widersprüchlicher Hypothesen und Theorien (BONNER 1998).

TRANTER (1986) erklärt die Präferenz für eine bestimmte Konfiguration in der Natur durch geringe energetische Unterschiede hinsichtlich der schwachen Wechselwirkung enantiomerer Moleküle, die für die Selektion der energetisch bevorzugten L-Enantiomere beim Einbau in Peptidketten in präbiotischer Zeit verantwortlich sein sollen. Das Enantiomer mit niedrigerer Energie ist nach TRANTER gegenüber seinem Spiegelbild um eine winzigen Energiebetrag, die sogenannte „paritätsverletzende Energiedifferenz“ (PVED), stabilisiert. Berechnungen der PVED-Werte für Aminosäuren und ein Proteinfragment ergaben in jedem Fall eine geringere Energie für das L-Enantiomer im Vergleich zur D-Form, wodurch bewiesen würde, daß die Präferenz für eine homochirale Biochemie nicht auf Zufällen beruht, sondern auf subatomaren Phänomenen, die sich auf Molekülstrukturen auswirken.

BONNER (1995, 1998) hingegen führt diese homochirale Biochemie auf extraterrestrische Kontamination der präbiotischen Erde mit Interstellarstaub, Asteroiden und Meteoriten zurück, die einen durch asymmetrische Photolyse hervorgerufenen, sehr geringen Enantiomerenüberschuß aufwiesen. Dieser geringe Überschuß soll in der Folge durch abiotische, autokatalytische und stereoselektive Anreicherungsprozesse zur Bildung von immer größeren, sich letztendlich selbst replizierenden

Molekülen und somit zur Entstehung des Lebens mit seiner homochiralen Biochemie geführt haben.

## 1.1.1 Begriffsbestimmungen

Das Wort chiral leitet sich von dem griechischen Wort *cheir*, das „Hand“ oder „Händigkeit“ bedeutet, ab. Diese Bezeichnung geht darauf zurück, daß sich chirale Objekte wie rechte und linke Hand zueinander verhalten, d.h. wie Bild und Spiegelbild, und sich somit nicht zur Deckung bringen lassen. Chirale Moleküle dürfen demnach weder eine Symmetrieebene noch ein Symmetriezentrum enthalten.

Die sich zueinander wie Bild und Spiegelbild verhaltenden Stereoisomere eines Moleküls werden als *Enantiomere* bezeichnet. Diese wiederum stimmen in den meisten physikalischen Eigenschaften überein; eine bemerkenswerte Ausnahme ist jedoch das Verhalten einzelner Enantiomere gegenüber linear polarisiertem Licht. So wird die Schwingungsebene eines Strahls linear polarisierten Lichtes von einem Enantiomer um einen bestimmten Betrag in eine Richtung gedreht, während das andere Enantiomer linear polarisiertes Licht um den gleichen Betrag jedoch in entgegengesetzte Richtung dreht. Erfolgt diese Rotation im Uhrzeigersinn, so bezeichnet man das Enantiomer als rechtsdrehend (oder willkürlich als (+)-Enantiomer). Entsprechend wird das linear polarisierte Licht im Gegenuhrzeigersinn drehende Enantiomer als linksdrehend oder (-)-Enantiomer bezeichnet. Daher spricht man bei Enantiomeren auch häufig von *optischen Isomeren* oder *Antipoden* mit dem beobachteten Phänomen der *optischen Aktivität* (MISLOW 1972).

Verhalten sich zwei Stereoisomere eines Moleküls nicht wie Bild und Spiegelbild zueinander, so handelt es sich um *Diastereomere*. Im Gegensatz zu Enantiomeren sind Diastereomere Moleküle mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften. Einen Spezialfall unter den Diastereomeren stellen die *Epimere* dar. Sie bezeichnen Diastereomere, die sich bei Vorhandensein mehrerer Chiralitätszentren nur in der Konfiguration an einem einzigen asymmetrischen C-Atom unterscheiden (MISLOW 1972).

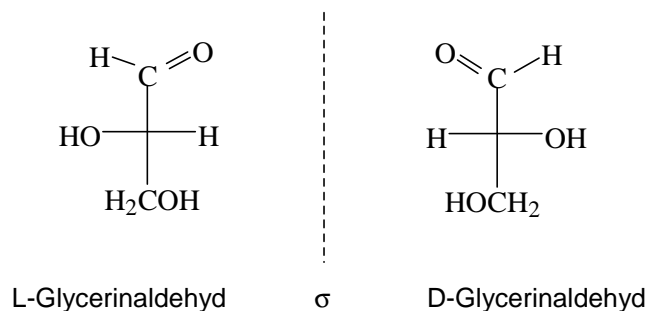
Erfolgt unter Einfluß chemisch-physikalischer oder biochemischer Prozesse die teilweise Umwandlung eines Enantiomers in seinen Antipoden hat sich historisch

bedingt der Begriff „Racemisierung“ oder synonym „Isomerisierung“ eingebürgert. Dies ist jedoch im streng chemischen Sinne nicht korrekt, da Racemisierung bedeutet, daß „ein Enantiomer über irgendeinen Prozeß mit seinem Spiegelbild ins Gleichgewicht gebracht“ wird (VOLLHARDT 1988). Im folgenden soll jedoch aus Gründen der Einfachheit der klassische Racemisierungsbegriff als teilweise Umwandlung eines Enantiomers in seinen Antipoden beibehalten werden, erweitert um den Begriff *Epimerisierung*, sofern nicht das Enantiomer sondern ein Epimer entsteht.

### 1.1.2 Nomenklatur

Die absolute Konfiguration chiraler Moleküle war vor Entdeckung der Röntgenstrukturanalyse unbekannt. Zur Schaffung eines einheitlichen Systems von relativen Konfigurationen wurden von Emil Fischer willkürlich beiden Enantiomeren des Glycerinaldehyds Konfigurationen zugeordnet. Zur Ermittlung der Konfiguration wird ein Molekül in der Fischerprojektion wie folgt dargestellt: das Molekül wird als Kreuz mit dem chiralen Kohlenstoff im Schnittpunkt der beiden Achsen gezeichnet. Die längste Kohlenstoffkette steht vertikal, das am höchsten oxidierte Ende der Kette steht oben, und die horizontalen Bindungen an jedem Atom der Hauptkette zeigen hinter die Papierebene (Abb. 1-1).

Das Enantiomer des Glycerinaldehyds, bei dem die Hydroxylgruppe in der Fischerprojektion nach rechts zeigt, wurde von Fischer willkürlich als D-Glycerinaldehyd (D = dexter, rechts) bezeichnet, während dasjenige mit linksstehender Hydroxylgruppe als L-Glycerinaldehyd (L = laevus, links) gekennzeichnet wurde (VOLLHARDT 1988).



**Abb. 1-1** L- und D-Glycerinaldehyd in der Fischerprojektion,  $\sigma$  = Spiegelebene

Alle asymmetrischen Moleküle, deren Strukturen mit der des D-Glycerinaldehyds verwandt sind, werden der D-Konfiguration zugeordnet; diejenigen, die sich chemisch vom L-Glycerinaldehyd ableiten lassen, gehören der L-Konfiguration an.

Zur eindeutigen Benennung von Enantiomeren wurde von Cahn, Ingold und Prelog, die *R,S*-Nomenklatur entwickelt, wonach die Chiralität an einem Kohlenstoff nach absteigenden Prioritäten der einzelnen Substituenten mit Hilfe von Sequenzregeln bestimmt wird. Höchste Priorität besitzt dabei der Substituent mit der höchsten Ordnungszahl.

Für Aminosäuren (AS) hat sich, ebenso wie für die Zucker, die DL-Nomenklatur durchgesetzt und wird auch in den folgenden Ausführungen beibehalten, zumal sie sich bei den AS mit Ausnahme des Cysteins mit der *R,S*-Nomenklatur deckt (Abb. 1-2).

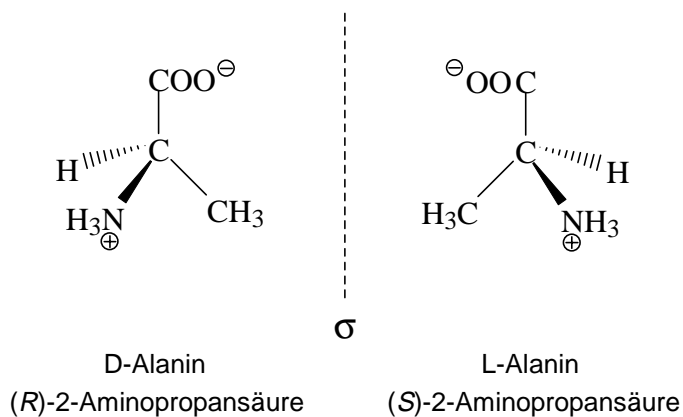


Abb. 1-2 Struktur von DL-Alanin bzw. 2-Aminopropansäure,  $\sigma$  = Spiegelebene

## 1.2 Vorkommen von D-Aminosäuren

### 1.2.1 Vorkommen von D-Aminosäuren in der unbelebten Natur

Kohlenstoffhaltige Meteoriten enthalten eine Vielzahl extraterrestrischer AS, die sowohl in der L- als auch in der D-Konfiguration vorliegen, wobei die L-Antipoden leicht überwiegen (ENGEL et al. 1990). So wurden z. B. im Murchison-Meteoriten, der 1969 in Australien niederging, 74 AS nachgewiesen, von denen jedoch nur acht

in Proteinen vorkommen. Weitere 11 besitzen andere biologische Funktionen, während die restlichen 55 AS nur in extraterrestrischen Matrices gefunden wurden (SALAM 1991; KVENVOLDEN et al. 1971; CRONIN 1989).

Auch in fossilen Matrices irdischen Ursprungs entstehen aufgrund einer nach dem Tod des Organismus ablaufenden Racemisierung proteinengebundener AS mehr oder weniger hohe Gehalte an D-AS, insbesondere D-Asparaginsäure (D-Asp), da Asp von allen proteinogenen Aminosäuren am leichtesten racemisiert (BADA und SCHROEDER 1975).

Bereits Ende der 1960er Jahre wurden Verfahren zur Altersbestimmung fossiler Knochen oder mariner Sedimente vorgeschlagen, welche auf der Höhe der Racemisierungsraten einzelner AS basieren (TUREKIAN und BADA 1972). Als Grundlage hierfür dienen sogenannte Racemisierungs-Halbwertszeiten der einzelnen Aminosäuren, die den Zeitraum beschreiben, der unter bestimmten Voraussetzungen verstreicht, bis 25% des D-Enantiomers (bzw. Epimers im Falle von Ile) gebildet wurden (BADA 1982). Unter der Voraussetzung einer weitgehenden Temperaturkonstanz und der Kalibrierung der AS-Racemisierungsraten in den entsprechenden Matrices (BADA und SCHRÖDER 1975) kann so die Erfassung des Racemisierungsgrades proteingebundener AS zur Altersbestimmung von Sedimenten und fossilen Funden eingesetzt werden (CSAPÓ et al. 1994; LUBEC et al. 1994). Dies gilt insbesondere für fossile Materialien, die zu alt für die Datierung mit der  $^{14}\text{C}$ -Technik sind (Alter > 40000 Jahre; MARSHALL 1990). Aufgrund der großen Variabilitäten der verschiedenen Umweltfaktoren über die Jahrtausende bis Jahrmillionen ist diese Methode der Altersbestimmung jedoch bis heute umstritten (DUNGWORTH 1976; MARSHALL 1990).

Auf der Grundlage solcher Racemisierungsprozesse in erdgeschichtlichen Zeiträumen und ihrer kinetischen Daten werden weiterhin Möglichkeiten diskutiert, diese Vorgänge auf andere Planeten, wie z.B. den Mars, zu übertragen. Ein positiver Befund bezüglich einer ähnlich verlaufenden Aminosäureracemisierung im Weltall könnte zu weitergehenden Erklärungen für die Entstehung des Lebens auf der Erde führen (BADA und MACDONALD 1995).

## 1.2.2 Vorkommen von D-Aminosäuren in lebenden Organismen

### 1.2.2.1 D-Aminosäuren in prokaryontischen Lebewesen

D-AS sind im Bereich der Mikroorganismen weit verbreitet, da diese einen ausgeprägten D-AS-Stoffwechsel besitzen, der sie zur Biosynthese der D-AS aus den L-Formen durch entsprechende Racemasen und Epimerasen befähigt (ADAMS 1972; vgl. Kap. 1.3.1.2).

Die bakterielle Zellwand enthält verschiedene D-AS, insbesondere D-Ala, D-Glu und D-Asp-Reste, als integrale Bestandteile des Peptidoglycans (SCHLEIFER und KANDLER 1972). Dabei handelt es sich um ein Heteropolymer, das aus den Disaccharidderivaten *N*-Acetylglucosamin (AGA) und *N*-Acetylmuraminsäure (AMS) sowie Peptiden besteht. Seine makromolekulare Struktur erhält das Peptidoglycan durch Glycosidbindungen zwischen den Disaccharidderivaten und den Peptidbindungen zwischen den alternierend angeordneten D- und L-AS und Peptidseitenketten (FRITSCH 1990). Diese Struktur dient mutmaßlich dem Schutz vor proteolytischem Abbau der Zellwand, da die Verknüpfung von D- und L-AS im Proteinverband außerordentlich stabil gegenüber dem Angriff von Proteasen ist (ROGERS 1983).

Genauso wie die Kettenlänge des Peptidoglycans (10-65 Disaccharideinheiten) variiert auch dessen genauer struktureller Aufbau von Organismus zu Organismus (SCHLEIFER und KANDLER 1972).

Auch im Zellpool von Bakterien wurden neben den bereits genannten zahlreiche weitere D-konfigurierte AS gefunden, wie z.B. D-Serin (D-Ser), D-Prolin (D-Pro), D-Leucin (D-Leu), D-Histidin (D-His) und D-Tyrosin (D-Tyr) (BHATTACHARYYA und BANERJEE 1974; RAUNIO et al. 1978; BRÜCKNER et al. 1993). Darüber hinaus konnten in einigen Untersuchungen D-AS auch in Lyophilisaten von verschiedenen Hefen nachgewiesen werden (BHATTACHARYYA und BANERJEE 1969; BRÜCKNER et al. 1995; SCHIEBER et al. 1999).

D-AS sind ebenfalls Bestandteil antibiotisch und teilweise hämolytisch wirksamer Polypeptide aus der von bestimmten Schimmelpilzen synthetisierten Gruppe der Peptaibole, sowie anderer Peptidantibiotika mikrobiellen Ursprungs, wie z.B. Actinomycin, Gramicidin, Bacitracin oder Polymyxin (DAVIES 1977; BYCROFT 1988). Diese Sekundärmetabolite werden im Gegensatz zur Proteinbiosynthese



nichtribosomal durch Multienzymkomplexe synthetisiert (KLEINKAUF und VON DÖHREN 1990), wobei Position und Konfiguration jeder eingebauten AS einen entscheidenden Einfluß auf die Sekundärstruktur und als unmittelbare Folge hiervon auf die biologische Wirksamkeit der jeweiligen Substanz haben (siehe auch Kap. 1.3.1.2).

### 1.2.2.2 D-Aminosäuren in eukaryontischen Lebewesen

#### 1.2.2.2.1 D-Aminosäuren in Pflanzen

In Pflanzen kommen D-Aminosäuren sowohl in peptidgebundener als auch in freier Form vor (ROBINSON 1976), häufig auch konjugiert als *N*-Malonyl- oder *N*-Acetyl-Derivate (FRAHN und ILLMAN 1975; FUKUDA et al. 1973; ZENK und SCHERF 1963, 1964; REKOSLAVSKAYA und GAMBURG 1984; REKOSLAVSKAYA et al. 1988). In der Wurzel der Sonnenblume *Helianthus annuus* liegen beispielsweise 40% des enthaltenen freien Ala als D-Enantiomer vor. In der Grasart *Phalaris tuberosa* wurden 7% D-Ala nachgewiesen. Ebenfalls in dieser Pflanze wurde das Dipeptid D-Ala-D-Ala gefunden (ROBINSON 1976), das auch in Wildreis (*Oryza australiensis*) auftritt (MANABE 1985). Weitere Konjugate in Form von L-Glutamyl-D-Ala und *N*-Malonyl-D-Ala wurden in Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*) nachgewiesen (OGAWA et al. 1973a, b, 1978; ROBINSON 1976). Weiterhin enthalten Samen der Pflanze *Caragana aborescens* und Früchte von *Malus pumila* D-Trp in Form des *N*-Malonyl-Derivates (DAVIES 1977). Die nichtproteinogene AS Pipecolinsäure (Pip) findet man in ihrer D-Form z.B. in Bucheckern verschiedener *Fagus*-Arten.

In einer Arbeit von BRÜCKNER und WESTHAUSER (1994) wurde der D-AS Gehalt von verschiedenen Obst- und Gemüsesorten untersucht. In Knoblauch wurde D-Ala, D-Asp, D-Glu, D-Leu und D-Val detektiert. In verschiedenen Kohlarten fanden sich Gehalte an D-Ala, D-Asp, D-Glu, D-Leu und D-Val. Frisch hergestellte Frucht- und Gemüsesäfte enthielten ebenfalls geringe Mengen an verschiedenen D-AS.

### 1.2.2.2.2 D-Aminosäuren im Tierreich

Erstmals wurde in den 1930er Jahren über das Vorkommen von D-AS in höheren Tieren berichtet. So wurde D-Ornithin (D-Orn) als Gewebe-Bestandteil des Haies *Acanthias vulgaris* identifiziert. Die erste D-AS, die chromatographisch (zweidimensionale Papierchromatographie) in tierischem Gewebe nachgewiesen werden konnte, war jedoch D-Ala im Blut der Käferart *Oncopeltus fasciatus*. D-Ser konnte in Anneliden wie dem Regenwurm *Lumbricus terrestris* und Insekten wie dem Seidenwurm *Bombyx mori* nachgewiesen werden (CORRIGAN und SRINIVASAN 1966; CORRIGAN 1969).

Neuere Studien befassen sich v.a. mit dem D-AS-Vorkommen in Wirbeltieren, häufig untersucht an Mäusen und Ratten. In Ratten konnten freies D-Asp und D-Glu in den verschiedensten Organen nachgewiesen werden (HASHIMOTO et al. 1993a; KERA et al. 1995), insbesondere jedoch in den Nebennieren, den Hoden, der Milz und der Hypophyse (0,1-0,2 µmol/g).

Die Anwesenheit substanzieller Mengen an freiem D-Asp und D-Ser in Säugetieren, speziell in endokrinen und Nervengeweben, wurde in mehreren aktuellen Studien belegt (SCHELL et al. 1997a, b; FEDELE et al. 1997; NAGATA et al. 1994; HASHIMOTO et al. 1993b). DUNLOP und NEIDLE (1997) berichteten über die Synthese und Metabolisierung von D-Ser im Gehirn von Ratten und Mäusen mit L-Ser als direktem Precursor. Die Funktion des D-Ser konnte dabei jedoch nicht geklärt werden. Dagegen konnten FEDELE et al. (1997) zeigen, daß D-Ser *in vivo* die Funktion des *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors im Zentralnervensystem von Ratten selektiv modulieren kann und somit möglicherweise eine Neurotransmitterfunktion erfüllt.

Peptide unterschiedlichster funktioneller Eigenschaften, die D-AS enthalten, konnten auch in höheren Lebewesen bei der afrikanischen Riesenschnecke (*Achatina fulica* Férussac) in Form von Neuropeptiden (MOR et al. 1992) und in Mollusken (YASUDA-KAMATANI 1998), im Gift der Spinne *Agelenopsis aperta* (HECK et al. 1996), sowie in opioid wirkenden Peptiden bei Fröschen (AMICE et al. 1998) und Mollusken (KREIL 1994a) identifiziert werden. Antimikrobiell und teilweise hämolytisch wirksame, D-AS enthaltende, Peptide wurden in Hautsekreten von Fröschen der Gattung *Bombina* nachgewiesen (MIGNOGNA et al. 1998).

D-AS sind demnach im Tierreich weit verbreitet, sowohl bei den Invertebraten als auch bei den Vertebraten. Sie finden sich in verschiedenen Körperflüssigkeiten genauso wie in vielen Organen in freier und/oder gebundener Form (SCHIEBER 1996).

### 1.2.2.2.3 D-Aminosäuren im menschlichen Organismus

Untersuchungen zum D-AS-Vorkommen im Menschen beschäftigen sich insbesondere mit der D-AS-Zusammensetzung des Gehirns und der menschlichen Körperflüssigkeiten (MAN et al. 1987; FISHER et al. 1991; D'ANIELLO et al. 1992; NAGATA et al. 1995; BRÜCKNER et al. 1994; ARMSTRONG et al. 1993a).

D-AS kommen beim Menschen auch in Körperproteinen vor, die geringe Turn-Over-Raten besitzen; so wurde D-Asp im Gehirn (FISHER et al. 1986), im Dentin (MASTERS HELFMAN und BADA 1975) und in der Augenlinse (MASTERS et al. 1977), hier insbesondere in der wasserunlöslichen Proteinfraction (MASTERS 1983), nachgewiesen.

Das von KÖGL und ERXLEBEN (1939) erstmals beschriebene Vorkommen von D-AS beim Menschen in Tumorproteinen wurde bereits kurz nach seiner Publikation kontrovers diskutiert (MILLER 1950) und konnte in neueren Studien unter Zuhilfenahme hochsensibler Analysetechniken (STROUD und SMITH 1984; FISHER et al. 1995; FISHER 1998) nicht bestätigt werden.

MAN et al. (1987) berichteten über unterschiedliche Gehalte an peptidgebundenem D-Asp in der weißen und grauen Substanz des Gehirns. Es konnte mit zunehmendem Alter ein Anstieg des D-Asp-Gehaltes in der weißen Gehirns substanz festgestellt werden, die dann ab einem Alter von 35 Jahren stagnierte und mit zunehmender Lebensdauer wieder etwas rückläufig war. Die Untersuchungen von Gehirnen von Alzheimer-Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu denen Gesunder. In einer weiteren Studie (FISHER et al. 1991) ergaben sich Unterschiede im D-AS-Gehalt der weißen Hirns substanz von Gesunden und Alzheimer-Patienten. In der weißen Gehirns substanz Gesunder wurden mehr als doppelt so hohe Absolutmengen an D-Asp nachgewiesen wie in der Gruppe der Alzheimer-Patienten. Bezogen auf die relativen D-Asp-Gehalte waren die Unterschiede jedoch deutlich geringer ausgeprägt. In beiden Studien ergaben sich

für die graue Hirnsubstanz keine signifikanten Unterschiede zwischen Gesunden und Alzheimer-Patienten.

D'ANIELLO et al. (1992) fanden bei Alzheimer-Patienten einen um das 1,4fache erhöhten Gehalt an proteingebundenem D-Ala im Vergleich zur Kontrollgruppe. NAGATA et al. (1995) konnten für freies D-Ser keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und Alzheimer-Gehirnen feststellen.

Von ARMSTRONG et al. (1993a) wurde der Gehalt freier D-AS in verschiedenen Körperflüssigkeiten des Menschen untersucht. Im Plasma und Urin wurden D-Phe, D-Pip, D-Pro und D-Tyr detektiert, im Urin konnte zusätzlich D-Trp nachgewiesen werden. Die absolut exkretierte D-Pip-Menge über den Urin war wesentlich geringer als die der anderen D-AS, der Anteil des D-Enantiomers an der ausgeschiedenen Menge Gesamt-Pip war jedoch mit im Mittel 86% enorm hoch. Der relative Anteil aller übrigen im Urin detektierten D-Enantiomere lag zwischen 0,2 und 3,9%. Im Blut konnten keine vergleichbar hohen relativen D-Pip-Gehalte detektiert werden. Die relativen D-AS-Anteile lagen hier für alle detektierten D-AS zwischen 0,6 und 1,3%. Weiterhin wurden auch Zerebrospinalflüssigkeit und Fruchtwasser des Menschen untersucht. Beide Flüssigkeiten wiesen freies D-Phe und D-Pro in geringen Mengen auf.

Im Rahmen von Untersuchungen des Urins von Gesunden, durchgeführt von BRÜCKNER et al. (1994), konnten D-Ala, D-Val, D-Thr, D-Ser und D-Phe als Urinbestandteile nachgewiesen werden.

D-Asp wurde in Form seines Methylesters aus Erythrocytenmembranproteinen isoliert. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, daß die spezifische Methylierung von D-Aspartylresten in Membranproteinen durch eine S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase einen Weg der Metabolisierung bzw. Reparatur veränderter Proteinstrukturen darstellen könnte (MCFADDEN und CLARKE 1982; O'CONNOR und CLARKE 1983, 1984).

In Untersuchungen des Blutplasmas von Gesunden und Patienten mit Nierenerkrankungen wurden D-Ser, D-Ala und D-Pro detektiert. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation der Plasmagehalte an D-AS mit der Höhe des Serum-Kreatinins, was zu dem Vorschlag führte, den Gesamtgehalt freier D-AS im Plasma

als Marker für den Grad einer Nierenerkrankung zu verwenden (NAGATA et al. 1992).

Die mittels Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC-MS) in der menschlichen Speichelflüssigkeit nachgewiesenen, vergleichsweise hohen Relativgehalte an D-Ala, D-Pro, D-Asp und D-Glu wurden auf die Tätigkeit der bakteriellen Oralflora zurückgeführt (ROTGANS et al. 1983).

#### 1.2.2.2.4 D-Aminosäuren in Lebensmitteln

Aus den obigen Ausführungen wird deutlich, daß D-AS auf der Erde ubiquitär verbreitet sind. Daraus folgt, daß auch die menschliche Nahrung eine reiche Quelle von D-AS in unterschiedlichsten Mengen und verschiedenster Herkunft darstellt. So werden D-AS durch mikrobielle Fermentations- und Reifungsprozesse gebildet und angereichert, d.h. Käse, Joghurt, Wein, Bier, Essig und eine Vielzahl weiterer Produkte weisen signifikante Mengen an D-AS auf (BRÜCKNER und HAUSCH 1989a, b, 1990a, b; HAUSCH 1990; BRÜCKNER et al. 1992; CHAVES DAS NEVES et al. 1990; CALABRESE et al. 1995; EKBORG-OTT und ARMSTRONG 1996; CHIAVARO et al. 1998).

Auch nichtfermentierte Lebensmittel wie Milch (ALBERTINI et al. 1996, GANDOLFI et al. 1992), Fruchtsäfte und Gemüse (BRÜCKNER und WESTHAUSER 1994, BRÜCKNER et al. 1995) oder Gelatine (LÜPKE und BRÜCKNER 1998) können D-AS enthalten. Die Gründe hierfür können neben dem nativen Vorkommen im entsprechenden Lebensmittel zum Einen in bakterieller Kontamination liegen, zum Anderen aber auch in durch technologische Be- und Verarbeitungsprozesse (Temperatur, Säuren, Laugen etc.) bedingter Racemisierung von proteingebundenen und/oder freien L-AS (GANDOLFI et al. 1994) (Mechanismen zur Entstehung von D-AS vgl. Kap. 1.3).

### 1.3 Entstehungsmechanismen zur Bildung von D-Aminosäuren

Generell erfolgt die Racemisierung von AS durch die unter bestimmten Umständen begünstigte Abspaltung eines Protons vom C<sup>α</sup>-Atom einer AS unter Ausbildung eines planaren sp<sup>2</sup>-hybridisierten Übergangszustandes (BADA 1984; FRIEDMAN und MASTERS 1982) verbunden mit einer Enolisierung (FRANK et al. 1981; BODANZKY 1984).

Da jedoch die Racemisierung von AS in Proteinen bzw. im Peptidverband teilweise anderen Gesetzmäßigkeiten unterliegt als die freier AS, soll im folgenden auf die unterschiedlichen Mechanismen für die Entstehung von D-AS und deren Bedeutung eingegangen werden.

#### 1.3.1 Racemisierung peptidgebundener Aminosäuren

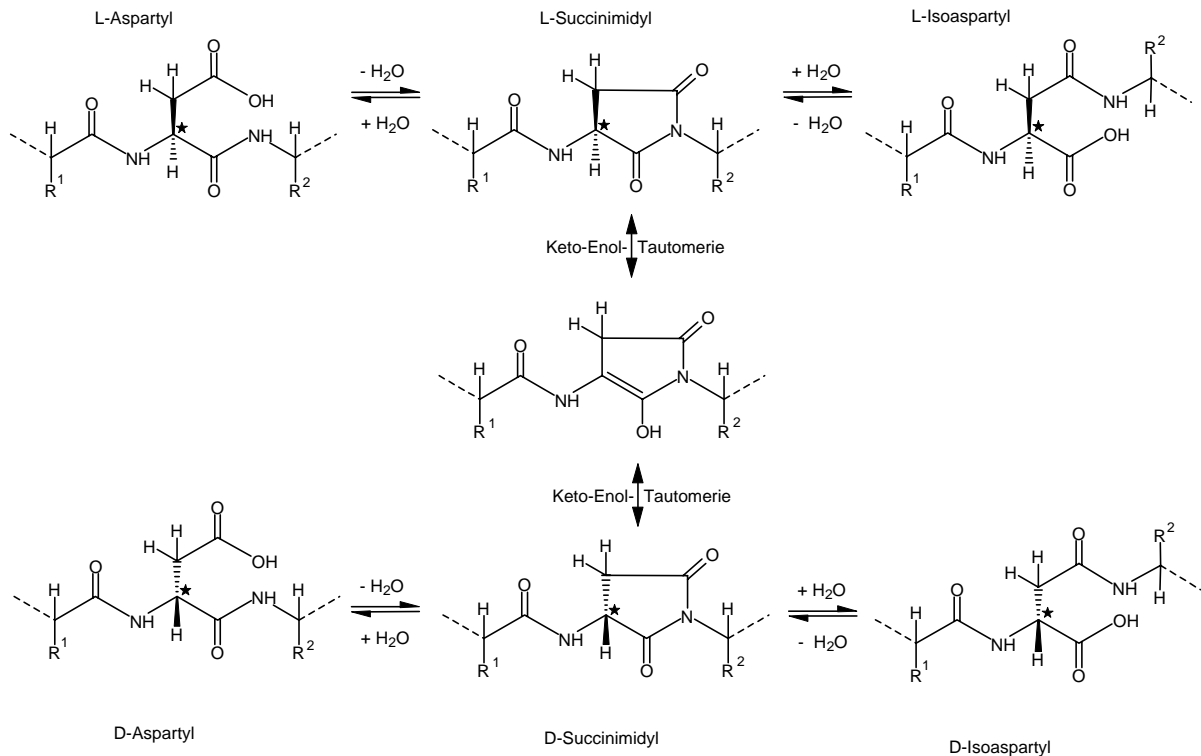
Die Rate bzw. die Anfälligkeit der Racemisierung einzelner AS innerhalb des Proteinverbandes oder Peptides ist stark abhängig von den Eigenschaften der Seitenkette (Rest -R) und von der AS in Nachbarstellung zu der betreffenden AS. Hier sind insbesondere die elektronenziehende Wirkung (BADA 1972; MASTERS und FRIEDMAN 1979) sowie sterische Effekte (FRANK et al. 1981) der unterschiedlichen -R Substituenten zu nennen.

Die Bindung Asn-Gly bzw. auch Asp-Gly ist aufgrund der möglichen Ausbildung eines zyklischen Succinimids (Abb. 1-3) besonders racemisierungsanfällig (bei Asn kommt es gleichzeitig zur Desaminierung), denn dieses L-Imid-Peptid kann durch Keto-Enol-Tautomerie in sein D-konfiguriertes Epimer umgewandelt werden (GEIGER und CLARKE 1987; BISCHOFF und KOLBE 1994; ROHER et al. 1993). Durch hydrolytische Ringöffnung der entsprechend konfigurierten Succinimidyl-Reste (Abb. 1-3) können L-Aspartyl- und L-*iso*-Aspartyl-Reste, bzw. D-Aspartyl und D-*iso*-Aspartyl-Reste im Verhältnis von etwa 1:3 gebildet werden (GEIGER und CLARKE 1987).

Durch Totalhydrolyse wird aus den Aspartyl-Resten, die in der *iso*-Form vorliegen, analog zu den „normalen“ Aspartyl-Resten D-Asp bzw. L-Asp freigesetzt, so daß eine solche strukturelle Veränderung in Peptiden analytisch nicht ohne weiteres zu erfassen ist.

# 1 Einleitung

Weiterhin werden noch andere Mechanismen, wie die Isoamidbildung oder Oxazolombildung diskutiert. Inwieweit diese an der Racemisierung von Asn-Gly und Asp-Gly Bindungen beteiligt sind ist unklar (GEIGER und CLARKE 1987), jedoch sind in geringerem Maße auch Asp-Ser-Bindungen racemisierungsanfällig, was auf die ebenfalls kleine Seitenkette des Serylrests zurückgeführt wird (BISCHOFF und KOLBE 1994).



**Abb. 1-3** Spontane Reaktionen, die zur Bildung veränderter Aspartylreste in Polypeptiden führen; der Stern symbolisiert das chirale C-Atom des Aspartyl- bzw. Succinimidylrests.

Steht Asp am C-terminalen Ende einer Peptidkette, kann Racemisierung durch Azlactonbildung induziert werden (BODANZKY 1984), dagegen wird für die N-terminale Stellung von Asp im Peptidverband eine Diketopiperazinbildung als Auslöser einer Racemisierung diskutiert (BOEHM und BADA 1984).

Durch solche Prozesse können sich demnach wesentliche strukturelle und in der Folge auch funktionelle Änderungen im betroffenen Proteinverband bis hin zum Bindungsbruch ergeben (GEIGER und CLARKE 1987).

### 1.3.1.1 Chemisch-physikalisch induzierte Racemisierung

Einen entscheidenden Einfluß auf die Racemisierungsrate von AS im Peptidverband haben neben der AS-Sequenz die Faktoren pH-Wert, Temperatur, Zeit, Druck, Ionenstärke, Strahlung und die Anwesenheit von Katalysatoren wie Schwermetallionen (HILL 1965; BADA 1982).

Schon vor mehr als 50 Jahren wurde nachgewiesen, daß extreme Säuren- oder Laugenbehandlungen von Proteinen eine bedeutende Racemisierung von AS in Proteinen nach sich ziehen (NEUBERGER 1948). Auch in neuerer Zeit wurden viele Untersuchungen zu diesem Themenbereich publiziert, wobei den Lebensmittelproteinen besondere Aufmerksamkeit galt (MASTERS und FRIEDMAN 1979; FRANK et al. 1981; FRIEDMAN und MASTERS 1982; LIARDON und HURRELL 1983; FRIEDMAN und LIARDON 1985; PAQUET und CHING-YUNG 1989). Demnach wurde für Asp die höchste Racemisierungsrate in stark sauren Medien (6 M HCl) ermittelt, gefolgt von Pro und Glu, während Ile, Val, Ser und Thr nur geringe Racemisierungsneigung aufwiesen. Dagegen racemisierte Ser – neben Asp, Phe, Glu und Val in absteigender Reihenfolge - unter stark alkalischen Bedingungen (1 M NaOH) am schnellsten (PAQUET und CHING-YUNG 1989).

Solche extremen Bedingungen werden jedoch im allgemeinen bei der Behandlung von Lebensmittelproteinen nicht als im Sinne der „Guten Hersteller Praxis“ angesehen, da es durch die auftretenden Denaturierungsprozesse zu einer herabgesetzten Digestibilität von Proteinen und Peptiden und damit zu einer Verringerung der biologischen Wertigkeit derselben kommt. Daher werden heute seitens der Lebensmittelindustrie möglichst schonende Verarbeitungsbedingungen angestrebt. Nichtsdestotrotz ist in einigen Fällen die Verwendung stark saurer oder alkalischer Bedingungen unumgänglich, wie z.B. bei der Gelatineherstellung (LÜPKE und BRÜCKNER 1998) oder der Sojahydrolysat- bzw. der Sojasaucenproduktion (NUMOMURA und SASAKI 1986). Diese Prozesse liefern signifikante Mengen an D-AS.

Starke Säuren bzw. Laugen begünstigen neben der Bildung zyklischer Intermediate demnach auch die Racemisierung bestimmter AS durch Protonierung bzw. Deprotonierung funktioneller Gruppen bzw. der AS-Seitenkette (FRANK et al. 1981). Diese Racemisierungsmechanismen werden in Kap. 1.3.2.1 dargestellt.



Auch unter vergleichsweise milden Bedingungen (neutraler pH-Wert, moderate Temperaturen zwischen 0 und 25 °C) können bei entsprechend langer Expositionsdauer Racemisierungsprozesse von AS voranschreiten (BADA 1972). Dieses Phänomen macht man sich auch in der Geochronologie und der Paläontologie zunutze (vgl. Kap. 1.2.1).

Besonders interessant ist das Phänomen, daß bereits die Heißwasserbehandlung (55 - 95 °C) von Gelatine mit steigender Temperatur offensichtlich zu einer vermehrten Racemisierung von Asparaginyll- und Aspartylresten im Peptidverband führen (vgl. Kap. 1.3.1). Daneben ist auch eine große Anzahl anderer AS mehr oder minder stark betroffen. Der Gehalt an D-Asp in Gelatine wurde daher als Marker für die thermische Behandlung von Gelatine vorgeschlagen (LÜPKE und BRÜCKNER 1998).

Der Einsatz von Mikrowellengeräten zur Erhitzung proteinhaltiger Nahrungsmittel führte nach einem Bericht von LUBEC et al. (1989) ebenfalls zur Racemisierung von AS, insbesondere von Pro und Hydroxyprolin (Hyp). Zwar werden Mikrowellen zur schnellen Hydrolyse von Proteinen und Peptiden, sowie zur schnellen Racemisierung freier AS mit Benzaldehyd unter Druck im geschlossenen Teflonvial eingesetzt (CHEN et al. 1987, 1989), Racemisierungsprozesse von AS unter haushaltsüblichen Erhitzungsbedingungen konnten in anderen Studien jedoch nicht bestätigt werden (FAY et al. 1991; MARCHELLI et al. 1992; FRITZ et al. 1992).

### **1.3.1.2 *In vivo* Racemisierung**

In lebenden Organismen kann es aus vielfältigen Gründen zu Racemisierungsprozessen kommen. Hier muß unterschieden werden zwischen aktiven „gewollten“ Prozessen der Synthese von D-AS zur Schaffung funktioneller Peptidstrukturen und der passiven, meist unerwünschten Racemisierung von L-AS aufgrund von Umwelteinflüssen.

#### **1.3.1.2.1 Funktionelle Strukturen**

Die Synthese des bereits in Kap. 1.2.2.1 beschriebenen bakteriellen Peptidoglycans erfolgt in zwei komplexen Stufen. Im ersten Schritt werden die Disaccharid-Peptid-

Monomere gebildet, und im zweiten erfolgt die Polymerisation mit anschließendem Einbau des neu gebildeten Peptidoglycan-Materials in die Zellwand. Der Einbau der D-AS in den Precursor im ersten Syntheseschritt erfolgt dabei durch cytosolische ATP-abhängige Synthetasen (VAN HEIJENOORT 1994) während die Synthese der benötigten D-AS durch spezielle D-AS-Transaminasen katalysiert wird (MARTINEZ DEL POZO et al. 1989).

Eine Vielzahl von Prokaryonten ist daneben in der Lage zur Synthese von sogenannten Peptidantibiotika, von denen eine ganze Reihe D-AS enthalten, sowie weitere ungewöhnliche Substituenten wie Ornithin (Orn), Aminoisobuttersäure u.a. (KLEINKAUF 1980). Es konnte gezeigt werden, daß die Biosynthese dieser Peptidabkömmlinge nicht durch den genetischen Code bestimmt wird, sondern daß die Funktionen von Transkription und Translation von einem hochmolekularen Proteinkörper übernommen werden, der die Strukturinformation für diese Antibiotika an seiner Oberfläche trägt. Als Beispiel für ein solches Peptidantibiotikum sei hier das cyclische Dekapeptid Gramicidin S genannt, welches zwei D-Phe und zwei L-Orn Reste beinhaltet. Bei der Synthese des Produktes wird ein L-Phe durch den Multienzymkomplex Gramicidin-S-Synthetase oder -Racemase in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert und anschließend in sein D-Enantiomer überführt (Gramicidin-S-Synthetase 1) Nur das D-Enantiomer des Phe wird dann auf 4'-Phosphopantethein übertragen, welches einen Cofaktor der Gramicidin-S-Synthetase 2 darstellt, an welcher die folgende Kettenverlängerung des Peptids erfolgt (KANDA et al. 1989; STEIN et al. 1995). Über die genaue Funktion dieser Peptidantibiotika wird noch spekuliert, es gibt jedoch Hinweise, daß sie wichtige Faktoren der Zelldifferenzierung darstellen. So soll Gramicidin-S bei *Bacillus brevis* eine Rolle bei der Regulation des Auswachsens der Sporen spielen (KLEINKAUF 1980, KLEINKAUF und VON DÖHREN 1990).

Über die Funktion der in höheren Pflanzen konjugiert und frei vorliegenden D-AS (vgl. Kap. 1.2.2.2.1) ist kaum etwas bekannt. Zwar gilt die endogene Synthese von D-Ala in Form des Konjugates *N*-Malonyl-D-Ala in Erbsensämlingen über eine D-AS Aminotransferase als wahrscheinlich (OGAWA et al. 1973a, b), unklar ist jedoch inwieweit andere D-AS zur Übertragung der Aminogruppe vorhanden sein müssen, da in den Sämlingen keine Ala-Racemase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Des weiteren können Pflanzen über ihr Wurzelsystem verschiedenste D-AS

aufnehmen, so daß der Nachweis einer endogenen D-AS-Synthese sehr schwierig zu führen ist (ROBINSON 1976). Aufgrund der Tatsache, daß über die Wurzel aufgenommene D-AS nach kurzer Zeit in Form ihrer *N*-Malonyl-Konjugate in Pflanzen nachweisbar waren, wurde postuliert, daß diese Konjugierung der D-AS einen Entgiftungsmechanismus der Pflanze für D-AS darstellt, indem die Produkte in die Vakuole transportiert werden (MATERN et al. 1983, 1984).

Im Gegensatz dazu sind funktionelle D-AS enthaltende Strukturen und deren Wirkungen im Tierreich gut charakterisiert (vgl. Kap. 1.2.2.2.2). Die Synthese dieser Oligopeptide, die an Position 2 des Peptids eine D-AS tragen, erfolgt aus einem gencodierten ribosomal synthetisierten Precursor-Peptid. In komplementärer DNA (cDNA) hergestellt aus mRNA dieser Precursor ist jedoch für Position 2 eine „normale“ L-AS codiert. Demnach erfolgt bei der Biosynthese solcher Peptide eine posttranslationale Modifikation durch Racemisierung der L-AS an Position 2. Dies wird auch dadurch bestätigt, daß der Versuch einer *in vitro* Synthese von Dermorphin, einem sehr potenten Opioid-Analgeticum des argentinischen Baumfrosches *Phyllomedusa sauvagei*, in einem vollkommen biologisch inaktiven Produkt resultierte, da die Sequenz des synthetischen Peptids mit einer L-AS an Position 2 ausgestattet war (VOLKMANN und HECK 1998).

Diese Befunde führten zu der Entdeckung der ersten Peptid-Isomerase in Eukaryonten in dem Gift der amerikanischen Trichternetzspinne *Agelenopsis aperta*. Diese Cofaktor-unabhängige Isomerase unterscheidet sich von anderen Cofaktor-unabhängigen Racemasen (z.B. Prolin-Racemase) dadurch, daß ihre Aktivität sich nicht auf freie AS beschränkt. Die Gleichgewichtsreaktion des vermutlich asymmetrischen, zweibasigen Enzyms verläuft in Richtung Isomerisierung von L- nach D-AS ca. 10fach schneller als in entgegengesetzter Richtung (KREIL 1994b; HECK et al. 1996; VOLKMANN und HECK 1998).

Solche funktionellen D-AS enthaltenden Strukturen sind bislang beim Menschen vollkommen unbekannt. Befunde über das Auftreten von peptidgebundenen D-AS beschränken sich bislang auf Modelle über physiologische Alterungsprozesse und pathophysiologische Phänomene (MASTERS et al. 1977; MASTERS HELFMANN und BADA 1975; FISHER et al. 1986; D'ANIELLO et al. 1992).

### 1.3.1.2.2 Physiologische Alterungsprozesse und pathophysiologische Phänomene

Im menschlichen Körper gibt es einige Proteinstrukturen, die nach ihrer Ausbildung keinem oder nur sehr geringem Turnover unterworfen sind (vgl. Kap. 1.2.2.2.3). Diese Proteine unterliegen einer zeitabhängigen Racemisierung. Das gilt zwar auch für andere Körperproteine, jedoch können bei Proteinen mit geringem Turnover nach erfolgter Racemisierung von AS im Peptidverband keine Reparaturmechanismen der Zelle greifen, um solche Schäden zu beheben. Demnach erfolgt sozusagen eine Inkubation der Proteine über mehrere Jahrzehnte bei 37 °C mit der Folge einer voranschreitenden *in vivo*-Racemisierung der peptidgebundenen AS, insbesondere von Aspartyl- und Asparaginyresten (BADA 1984). Demzufolge wurde die Racemisierungsrate von Asp bzw. Asn im humanen Zahndentin und Zahnschmelz als Marker zur Altersbestimmung lebender Personen und, unter bestimmten Voraussetzungen, zur Altersbestimmung zum Zeitpunkt des Todes des entsprechenden Individuums vorgeschlagen (MASTERS HELFMAN und BADA 1975; MASTERS et al. 1977; BADA 1984). Zahnschmelz stellte sich jedoch aufgrund der Abnutzungsproblematik und Kariesfällen und dadurch bedingter großer Schwankungsbreiten der Aspartyl-/Asparaginyl-Racemisierungsraten als weniger geeignete Matrix zur Altersbestimmung heraus (MASTERS HELFMAN 1976; OHTANI und YAMAMOTO 1992). GILLARD et al. (1990) kamen nach umfangreichen Untersuchungen unterschiedlichster Zahnmaterials archäologischer Herkunft zu dem Schluß, daß die Altersbestimmung anhand der Asp-Racemisierung im Vergleich zu anderen Methoden nicht mit zufriedenstellender Genauigkeit durchführbar sei.

Während die Racemisierung von peptidgebundenem Asp und Asn in Zähnen keine pathophysiologischen Auswirkungen zu haben scheint, wird ihr jedoch bei der Entstehung von Katarakt eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben. Als Auslöser hierfür werden photooxidative Prozesse und UV-Strahlung diskutiert. Bereits in den Linsenkernen Gesunder findet mit zunehmendem Alter eine steigende Racemisierung statt, diese ist bei Katarakt aber noch stärker ausgeprägt (MASTERS et al. 1977; MASTERS 1983; BADA 1984). Damit verbunden soll es durch zunehmende Bildung wasserunlöslicher Proteinaggregate zu einer vermehrten braunen Pigmentierung bei bestimmten Katarakttypen kommen (MASTERS 1983).

Für die Akkumulation von D-Asp im Gehirn von Alzheimer-Patienten, insbesondere in der myelinreichen weißen Hirnmasse, (vgl. Kap. 1.2.2.2.3) wird die vermehrte

Racemisierung individueller Asparaginyll- und Aspartylreste durch Succinimidbildung verantwortlich gemacht (SHAPIRA et al. 1988a, b; MAN et al. 1987; PAYAN et al. 1992). Dabei neigen die Bindungen Asp-Arg, Asp-Ser, Asp-Glu und Asp-Thr besonders stark zu Racemisierung, sofern sie nicht durch Fixierung an bestimmter Stelle der  $\beta$ -Faltblatt-Sekundärstruktur stabilisiert werden (SHAPIRA et al. 1988b). Durch Succinimidbildung tritt in Alzheimer-Gehirnen ebenfalls L-*iso*-Asp auf (PAYAN et al. 1992) (vgl. Kap. 1.3.1). Trotz aller Forschungsbemühungen ist jedoch bislang vollkommen ungeklärt, inwieweit die, sich aus der Racemisierung von Asp bzw. Asn im Peptidverband ergebenden, strukturellen Veränderungen (Plaques) Ursache oder Folgeerscheinung der Alzheimererkrankung oder anderer Erkrankungen des Zentralnervensystems darstellen.

### 1.3.2 Racemisierung freier Aminosäuren

Prinzipiell gelten für freie AS die gleichen Einflußgrößen auf die Racemisierungsrate wie bei peptidgebundenen AS (vgl. Kap. 1.3.1.1) mit der Ausnahme, daß keine induktiven oder sterischen Effekte durch C- und/oder N-terminale Nachbar-AS auftreten. Dadurch ergibt sich auch eine von peptidgebundenen AS abweichende Racemisierungsanfälligkeit der freien AS, die neben den äußeren Faktoren (pH, Druck, Temperatur etc.) bei letzteren im wesentlichen durch die Art der individuellen Seitenkette beeinflusst wird, die sterische und induktive Effekte ausübt und somit die Ausbildung eines planaren Übergangszustandes begünstigt bzw. behindert (FRANK et al. 1981).

#### 1.3.2.1 Chemisch-physikalisch induzierte Racemisierung

Im sauren pH-Bereich weist Asp die höchste Racemisierungsrate auf (FRANK et al. 1981; LIARDON und JOST 1981), wobei das Maximum, repräsentiert durch die Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Gleichgewichtsreaktion L-Asp  $\Leftrightarrow$  D-Asp bei einem pH-Wert von 2-3 liegt (BADA 1972). Diese Gleichgewichtsreaktion folgt einer Kinetik (pseudo)erster Ordnung.

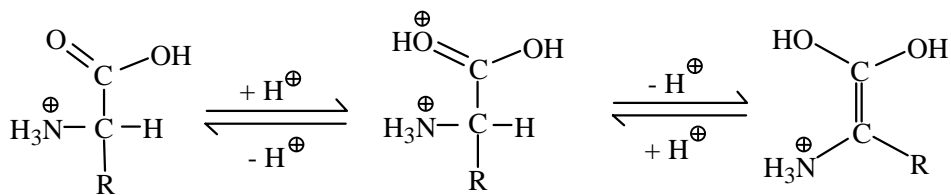
Beim Übergang von schwach sauren Verhältnissen über den neutralen bis hin zum basischen pH-Bereich existieren dagegen für monocarboxylische AS zwei Regionen,

# 1 Einleitung

in denen die Racemisierungsrate unabhängig vom pH-Wert zu sein scheint, und zwar zwischen pH 3 und ca. 6,5 und zwischen pH 9 und 12 (BADA 1982).

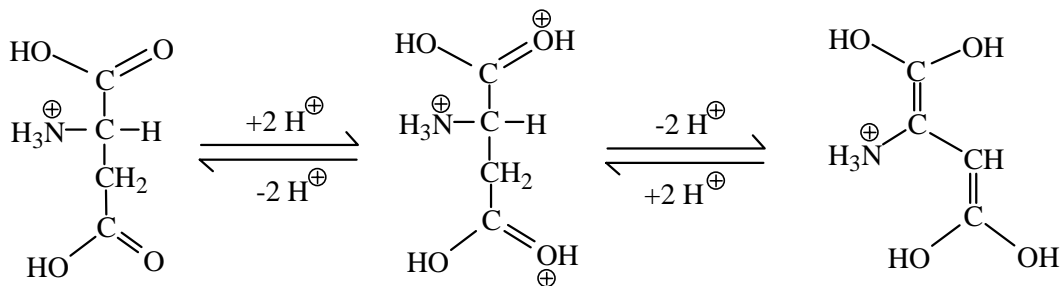
Bereits im neutralen pH-Bereich racemisiert freies Ser 10 mal schneller als Asp (STEINBERG et al. 1984). Dies wurde von den Autoren mit der bei pH 7,6, im Vergleich zu der bei Asp ionisiert vorliegenden  $\beta$ -Carboxylat-Gruppe, stärker elektronenziehenden  $\beta$ -Hydroxylgruppe des Ser erklärt.

In stark basischen Medien erfolgt die schnelle Racemisierung freier AS durch Abstraktion eines Protons vom  $C^\alpha$ -Atom unter Bildung eines planaren Carbanions (NEUBERGER 1948). Auch für den sauren pH-Bereich wird häufig ein Carbanion-Mechanismus der Racemisierung angegeben (BADA 1972, 1982). Ausgehend von einem hohen Protonenüberschuß scheint jedoch im Sauren ein Protonenkatalysierter Enolisierungsmechanismus (siehe Abb. 1-4) die realistischere Variante zu sein (FRANK et al. 1981).



**Abb. 1-4** Protonen-katalysierte Enolisierung von Aminosäuren, R = spezifischer Rest der einzelnen Aminosäuren (nach FRANK et al. 1981)

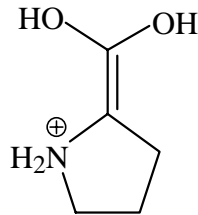
Am Beispiel der dicarboxylischen AS Asparaginsäure wird der Einfluß der Seitenkette R auf die Racemisierungsrate besonders deutlich (Abb. 1-5).



**Abb. 1-5** Ausbildung einer Protonen-katalysierten konjugierten Dienolstruktur bei Asparaginsäure (nach FRANK et al. 1981)

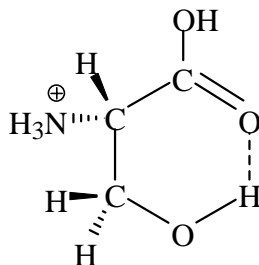
Durch die Resonanzstabilisierung der konjugierten Doppelbindung erklärt sich die relativ zu den anderen AS im stark Sauren (6 M HCl) höchste Racemisierungsrate von Asp (FRANK et al. 1981).

Auch die sekundäre AS Pro ist in konzentrierten starken Säuren racemisierungsanfällig. Verantwortlich hierfür ist die Ausbildung einer exozyklischen Doppelbindung durch Enolisierung (Abb. 1-6).



**Abb. 1-6** Stabilisierung von Prolin in stark saurer Lösung durch Ausbildung einer exozyklischen Doppelbindung (nach FRANK et al. 1981)

Dagegen ist die geringe Racemisierungsrate von Serin (Ser) und Threonin (Thr) vermutlich auf die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen Hydroxylgruppe und dem Carboxylsauerstoff zurückzuführen, die die Enolisierung weitgehend blockiert (FRANK et al. 1981) (siehe Abb. 1-7).



**Abb. 1-7** Blockierung der Enolisierung des Serin im stark Sauren durch Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke (nach FRANK et al. 1981)

Die sehr niedrigen Racemisierungsraten für Isoleucin (Ile) und Valin (Val) lassen sich durch sterische Effekte begründen. Die wechselseitige sterische Hinderung der sperrigen Seitenkette mit tertiären C<sup>β</sup>-Atom und der Hydroxylgruppe der konjugierten Säure (vgl. Abb. 1-4) führt zu einer Unterdrückung der planaren sp<sup>2</sup>-hybridisierten Struktur.

Die Mechanismen der Racemisierung der AS in stark sauren und basischen Medien scheinen also weitgehend geklärt. Dagegen existieren für den schwach sauren pH-

Bereich, insbesondere für das atypische Racemisierungsverhalten von Asp nur wenig befriedigende Erklärungsansätze (BADA 1972, 1982; STEINBERG et al. 1984).

Neben den genannten Einflüssen wurde für freie AS, sowohl im festen Aggregatzustand als auch in wässriger Lösung, eine durch  $\gamma$ -Strahlung induzierte Radoracemisierung nachgewiesen (BONNER und LEMMON 1978).

### 1.3.2.2 Mikrobiologisch – enzymatisch induzierte Racemisierung

Eine Vielzahl von Mikroorganismen ist mit einem Enzymsystem ausgestattet, welches die Synthese von D-AS ermöglicht (vgl. Kap. 1.2.2.1). Hier läßt sich unterscheiden zwischen Cofaktor-abhängigen und Cofaktor-unabhängigen Racemasen bzw. Epimerasen, sowie zwischen Enzymen mit hoher oder niedriger Substratspezifität.

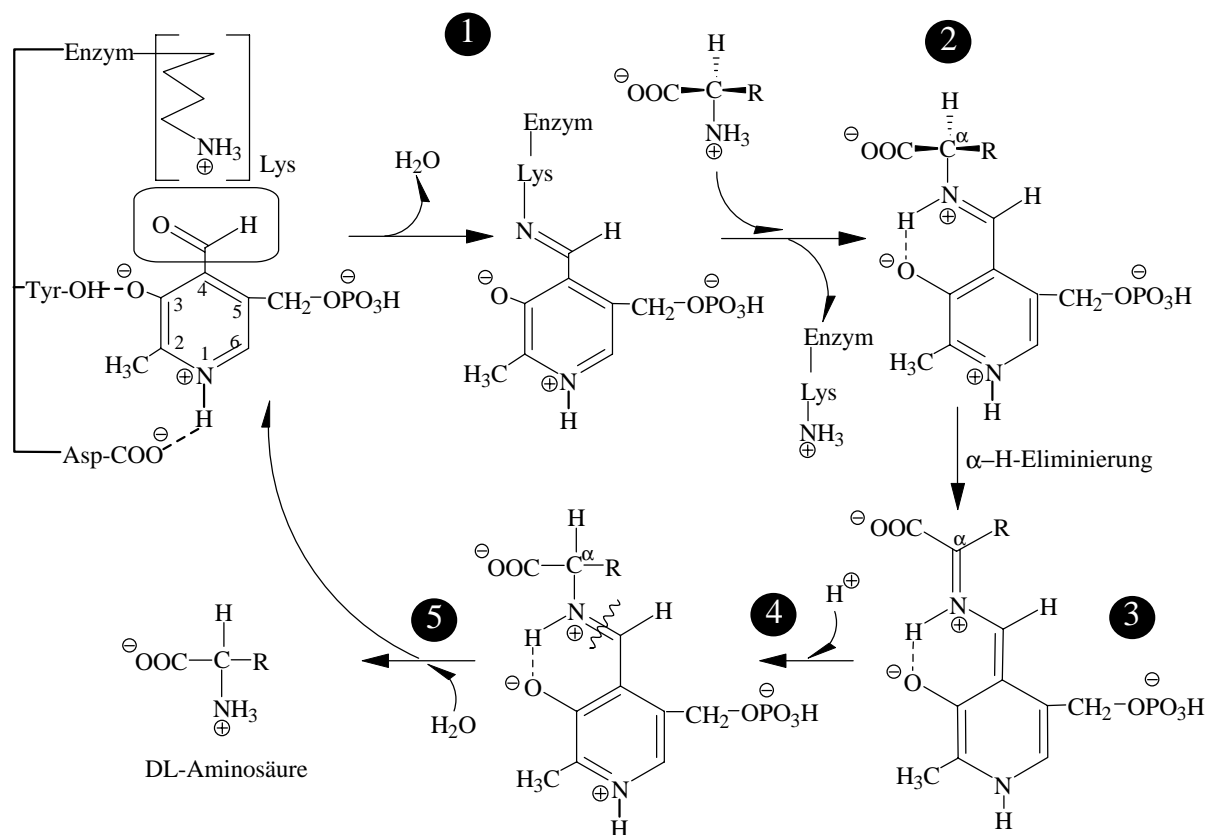
Zu den Cofaktor-abhängigen Racemasen gehört beispielsweise die Ala-Racemase aus *Streptococcus faecalis* (BADET und WALSH 1985). Als häufigster Cofaktor von Racemasen ist das Pyridoxalphosphat (PLP), auch als Vitamin B<sub>6</sub> bekannt, anzutreffen. Das Reaktionsprinzip PLP-abhängiger Enzyme geht grundsätzlich von der Reaktivität der 4-ständigen Aldehydgruppe gegenüber primären Aminen aus, die durch das N-Atom des Pyridinrings und seine Wechselwirkung mit der Proteinkomponente stark erhöht ist (Abb. 1-8).

Der Cofaktor ist stabil mit dem aktiven Zentrum verknüpft (prosthetische Gruppe), wobei die Bindung kovalent über eine Aldiminbindung zwischen der Aldehydgruppe und einer Lys-Seitenkette im aktiven Zentrum erfolgt (Abb. 1-8 ❶) (SCHELLENBERGER 1989; RÉTEY und ROBINSON 1982; CREIGHTON und MURTHY 1990).

AS reagieren unter Transaldiminierung mit dem internen Aldimin, gebildet zwischen PLP und dem Lys-Rest auf der aktiven Seite des Enzyms (Abb. 1-8 ❷). Durch den dabei auf das C<sup>α</sup>-Atom übertragenen Elektronenmangel kommt es nachfolgend zur Abspaltung eines Protons, wobei das am C<sup>α</sup>-Atom verbleibende Elektronenpaar über das aromatische Ringsystem unter Ausbildung einer chinoiden Struktur und Protonierung des Ring-N-Atoms delokalisiert wird. Eine H-Brücke zwischen der 3-ständigen OH-Gruppe und dem Substrat-Aminostickstoff unterstützt diesen Prozeß



unter Bildung eines ebenen Resonanzsystems (Abb. 1-8 ③) (SCHELLENBERGER 1989). Durch anschließende unspezifische Reprotonierung am C<sup>α</sup>-Atom (Abb. 1-8 ④) und hydrolytische Freisetzung unter Regeneration des aktiven Enzyms (Abb. 1-8 ⑤) erfolgt bei Racemasen die Bildung gleicher Anteile an D- und L-AS. Des weiteren kann es im Falle spezifischer D-AS-Transaminasen zur Übertragung einer Aminogruppe auf α-Ketosäuren unter intermediärer Bildung von Pyridoxaminmonophosphat mit dem Produkt einer weiteren D-AS kommen, wie z.B. bei der D-Ala-D-Glu Transaminase (MARTINEZ-CARRION und JENKINS 1965).



**Abb. 1-8** Reaktionsmechanismus Pyridoxalphosphat-abhängiger Racemasen (modifiziert nach SCHELLENBERGER 1989)

Zu den Cofaktor-unabhängigen Racemasen gehören die Pro-Racemase aus *Clostridium sticklandii* (STADTMAN und ELLIOT 1957; CARDINALE und ABELES 1968), die Hyp-2-Epimerase aus *Pseudomonas striata* (ADAMS und NORTON 1964; ADAMS 1972) sowie die Glu-Racemase aus *Lactobacillus fermenti* (GALLO et al. 1993). Der Mechanismus der Racemisierung ist für die Pro-Racemase am besten aufgeklärt (FISHER et al. 1986a, b, c; BELASCO 1986a, b, c). Dabei handelt es sich

um ein dimeres Enzym mit jeweils einer Substratbindungsstelle pro Untereinheit. Das katalytische Zentrum des Enzyms besteht aus einem Paar räumlich so angeordneter Thiolgruppen, daß die jeweils katalytisch aktive Form dadurch bestimmt wird, welche der beiden Thiolgruppen protoniert und welche deprotoniert vorliegt. Die eine Form des Enzyms bindet spezifisch L-Pro, die andere D-Pro, jeweils unter Abstraktion des Substratprotons am chiralen C<sup>α</sup>-Atom (ALBERY und KNOWLES 1986; FISHER et al. 1986a). Es handelt sich also um einen zweibasigen Reaktionsmechanismus, wobei die Reprotonierung des Substrats entweder über eine konzertierte Aktion oder über ein Carbanion-Intermediat verlaufen kann. Ein entsprechender Reaktionsweg, der zwei Thiolgruppen involviert, wird auch für die Hyp- und die Glu-Racemase postuliert (CARDINALE und ABELES 1968; GALLO et al. 1993).

### 1.4 Metabolismus und Wirkung von D-Aminosäuren

Der Mensch nimmt aufgrund der ubiquitären Verbreitung von D-AS über die Nahrung signifikante Mengen an D-AS auf, insbesondere über Lebensmittel, die Fermentations- und Reifungsprozessen unterworfen sind (vgl. Kap. 1.2.2.2.4). Im folgenden soll der Frage des Verbleibs dieser nicht proteinogenen AS-Enantiomere im Organismus nachgegangen werden.

Aufgrund seiner Ausstattung mit Verdauungsenzymen für AS-haltige Strukturen (Pepsin des Magens, Exo- und Endopeptidasen des Pankreas, sowie Peptidhydrolasen der Enterocytenmembran) kann der Mensch Proteine und Peptide, die aus proteinogenen L-AS aufgebaut sind, bis hin zu Tri- und Dipeptiden und letztendlich freien AS aufspalten, welche dann aktiv oder passiv über die Darmmucosa resorbiert werden (LEIBACH und GANAPATHY 1996; PALACÍN et al. 1998; STRYER 1990; FRIEDRICH 1982). Sollte ein Nahrungsprotein aufgrund unterschiedlichster Ursachen einer intramolekularen Racemisierung unterlegen haben (vgl. Kap. 1.3.1), so kann das Protein nur teilweise aufgespalten werden, da Bindungen zwischen D- und L-AS den menschlichen Verdauungsenzymen nicht zugänglich sind (MAN und BADA 1987). Größere Peptidbruchstücke können nicht resorbiert werden und werden folglich mit den Faeces ausgeschieden, während Di- oder Tripeptide, die eine oder mehrere D-AS enthalten, durch den intestinalen

Peptidtransporter resorbiert werden können (LEIBACH und GANAPATHY 1996). Dieser weist zwar eine höhere Affinität zu reinen L-Peptiden auf, jedoch werden gemischte Peptide je nach Stellung der D-AS (C-terminal, zentral oder N-terminal) ebenfalls mit jeweils unterschiedlicher Affinität in signifikanten Mengen transportiert. Durch den in der Niere lokalisierten Peptidtransporter ist der Organismus zusätzlich zur Reabsorption filtrierter gemischter Peptide in der Lage (LEIBACH und GANAPATHY 1996).

Freie D-AS werden ebenfalls teilweise aktiv resorbiert, und zwar über mehrere spezielle AS-Transporter, die für bestimmte AS-Gruppen (z.B. saure, basische oder verzweigt-kettige) jeweils besondere Substratspezifitäten aufweisen. In der Regel weisen die AS-Transporter deutlich höhere Affinitäten zu den L-Enantiomeren auf, es ist jedoch auch ein anionisches System bekannt, welches D- und L-Asp mit identischer Affinität transportiert (PALACÍN et al. 1998).

Ein Großteil der resorbierten D-AS wird unverändert über die Niere exkretiert. Der jeweilige Anteil ist jedoch abhängig von der individuellen AS, sowie von dem Angebot weiterer D-AS bzw. auch der Verfügbarkeit an den entsprechenden nutritiven L-Enantiomeren (BENEVENGA und STEELE 1984; HEINE et al. 1983). Tracer-Studien mit <sup>15</sup>N-markierten AS zeigten, daß D-AS teilweise zu einem unerwartet hohen Anteil via Transaminierung bzw. Fixierung des durch die D-AS-Oxidase (DAO) freigesetzten Aminostickstoffs in L-AS konvertiert werden und somit zur Proteinbiosynthese herangezogen werden können (HEINE et al. 1983). Demnach können D-AS nicht als vollständig nichtnutritiv angesehen werden.

Bereits 1948 konnte das Enzym DAO aus Leber, Niere und Gehirn verschiedener Säugetierspezies isoliert werden (KREBS 1948). Etwa 20 Jahre später konnte das Enzym D-Asp-Oxidase (DASPO) aus Hasennieren isoliert werden (DIXON und KENWORTHY 1967). Beide Enzyme sind in den Peroxisomen lokalisiert. Sie sind als Flavoenzyme Cofaktor-abhängig und besitzen Flavin Adenin Dinucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe. Die Katalyse der spezifischen Umsetzung von D-AS mit Sauerstoff zu  $\alpha$ -Ketosäuren, Ammoniak und Wasserstoffperoxid (oxidative Desaminierung) erfolgt bei der DAO bei einer großen Bandbreite an D-AS mit unterschiedlicher Substratspezifität, während die DASPO sehr spezifisch einzig die dicarboxylischen D-AS oxidiert (DIXON und KLEPPE 1965; DIXON und KENWORTHY 1967). Die aus menschlichem Lebergewebe isolierte DASPO zeigte

eine exklusive Spezifität für D-Asp (BARKER und HOPKINSON 1977), wohingegen die DASPO anderer Mammalia auch D-Glu, jedoch mit weitaus geringerer Umsetzungsgeschwindigkeit (ca. 16% der Rate von D-Asp), oxidiert (DIXON und KENWORTHY 1967).

Gegenüber den dicarboxylischen D-AS sowie Cystein und Cystin zeigt wiederum die DAO keinerlei Aktivität. Die Substrate mit der höchsten Affinität zum Enzym sind D-Phe, D-Tyr, D-Leu, D-Pro, D-Ile und D-Ala. Geringere Umsetzungsraten wurden bei den basischen und den Hydroxy-AS beobachtet (BARKER und HOPKINSON 1977).

Die bei der Enzymreaktion freigesetzten  $\alpha$ -Ketosäuren stehen dem Organismus zur Energiegewinnung (Citratzyklus) und teilweise zu Transaminierungsreaktionen bereit, d.h. zur Synthese von proteinogenen L-AS (HEINE et al. 1983).

Aus diesen Ausführungen wird deutlich, daß das Postulat der generellen Toxizität von D-AS für den Säugerorganismus deutlich zu relativieren ist. Studien über die Auswirkungen extensiver Zufuhr von L- und D-AS ergaben zudem interessanterweise für die L-AS, mit Ausnahme von Asp und Ser, stärker toxische Effekte der L-Form im Vergleich zum entsprechenden D-Enantiomer (BENEVENGA und STEELE 1984).

Ergebnisse, die auf die Toxizität von D-AS schließen ließen (Wachstumsrückgang, Entwicklungsstörungen, nekrotische Veränderungen), stammen oft aus Tierversuchen, in denen sehr hohe Dosen einzelner D-AS per Intraperitoneal- oder gar Intraventrikularinjektion verabreicht wurden (GANOTE et al. 1974; KALTENBACH et al. 1979).

Die von KAMPEL et al. (1990) ermittelte Toxizität von D-Pro bei Ratten in Form nekrotischer und fibrotischer Leberveränderungen sowie Läsionen des renalen tubulären Systems nach oraler Gabe von 50 mg D-Pro/kg Körpermasse über einen Zeitraum von vier Wochen konnte kürzlich, bei Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen, klar widerlegt werden (SCHIEBER et al. 1997). Gleichzeitig wurden weder für D-Asp noch für D-Ser toxische Effekte beobachtet.

D-Ser scheint jedoch eine D-AS zu sein, die unter bestimmten Umständen toxisch wirken kann. Schädigungen (Nekrose der Tubuluszellen, Proteinurie, Glucosurie) nach einer intraperitoneal verabreichten Dosis von 80 mg/100 g Körpermasse traten jedoch nur bei Ratten auf und waren 5-6 Tage nach der Applikation vollständig

reversibel (GANOTE et al. 1974). Neueste Studien an Ratten deuten darauf hin, daß die nephrotoxische Wirkung von D-Ser auf der Bildung von  $H_2O_2$  beruht. Gelangt D-Ser nämlich aus dem Plasma ins glomeruläre Filtrat, so wird es nicht im proximalen Tubulus reabsorbiert, sondern bis zum Reabsorptionsort im distalen Tubulus, dem Ort der renalen DAO, aufkonzentriert. Dadurch entstehen entsprechend lokal begrenzt hohe Mengen an  $H_2O_2$  durch den D-Ser-Metabolismus mit der Folge oxidativer Schädigung der Tubuluszellen (SILBERNAGL et al. 1999). Dieser Mechanismus könnte auch für andere D-AS zutreffen.

Eindeutig gegen toxische Effekte von D-AS auf den menschlichen Organismus spricht die Tatsache, daß bis Ende der 1970er Jahre in der klinischen Anwendung bei totaler parenteraler Ernährung (TPN) in den ehemaligen Ostblockländern Racemat-AS-Lösungen eingesetzt wurden, ohne daß es zu irgendwelchen pathophysiologischen Erscheinungen gekommen wäre (BANSI et al. 1964; HEINE und DRESCHER 1975; HEINE et al. 1983). Da jedoch die erhöhte renale Exkretion der nicht utilisierten D-AS problematisch für Patienten mit Nierenfunktionsstörungen war und wegen der unterschiedlichen Metabolisierbarkeit der einzelnen D-AS, die zu Schwierigkeiten bei der Berechnung der AS-Bedarfsmengen führte, wurde zu Beginn der 1980er Jahre weitgehend auf reine L-AS-Infusionslösungen umgestellt (HEINE et al. 1983).

Über positive Wirkungen von D-AS existieren ebenfalls einige interessante Studien. So wurde D-Phe erfolgreich als nebenwirkungsfreies Analgetikum bei Patienten mit chronischen Schmerzen eingesetzt (BALAGOT et al. 1983). Auch sein Einsatz bei der Parkinson-Erkrankung (HELLER et al. 1976) und als Antidepressivum (FISHER et al. 1975; BECKMANN und LUDOLPH 1978) zeigte sich erfolgversprechend, wurde allerdings nicht zur Therapie in der Praxis eingeführt.

## **1.5 Analytische Methoden zur Bestimmung von D- und L-Aminosäuren**

### **1.5.1 Klassische Methoden**

Aufgrund der unterschiedlichen Drehung linear polarisierten Lichts läßt sich die optische Reinheit eines AS-Enantiomeren anhand des spezifischen Drehwinkels der Reinsubstanz eines Enantiomeren im Vergleich zur vorliegenden Probe polarimetrisch bestimmen. Diese Methode ist jedoch für die Bestimmung von komplexen AS-Gemischen wenig geeignet, da das Enantiomerenpaar einer AS in isolierter Form vorliegen muß (SODA 1968).

Durch die spezifische enzymatische Reaktion der DAO und L-AS-Oxidase mit den entsprechenden AS-Enantiomeren läßt sich ebenfalls eine stereoselektive Bestimmung durchführen (SODA 1968). Werden die Enzyme auf Elektroden immobilisiert und mit einer flüssigchromatographischen Anlage gekoppelt, so ist auch die Detektion einzelner Enantiomere in komplexen AS-Gemischen möglich (YAO und WASA 1988). Allerdings sind die Resultate aufgrund der stark differierenden Substratspezifität der AS-Oxidasen und unterschiedlichen Reaktionskinetiken der AS mit relativ großen Ungenauigkeiten behaftet (DIXON und KLEPPE 1965; VÁRADI et al. 1999).

Eine weitere Möglichkeit stellt die Ionenaustauschchromatographie dar. Dabei erfolgt die Trennung der DL-AS nach Umsetzung mit L-AS-Carboxyanhydriden zu diastereomeren Dipeptiden (MANNING und MOORE 1968).

### **1.5.2 Moderne chromatographische Methoden**

#### **1.5.2.1 Gaschromatographische Methoden**

In der GC überwiegen im Vergleich zur hochauflösenden Flüssigchromatographie (HPLC) (siehe Kap. 1.5.2.2) Trennverfahren, die auf der Integration eines chiralen Selektors in die stationäre Phase beruhen. Die jeweiligen AS-Enantiomeren werden dabei als solche „direkt“ getrennt. So arbeitete man einige Zeit mit stationären Phasen auf der Basis *N*-substituierter AS wie z.B. Trifluoracetyl-L-Ile-Laurylester (GIL-AV et al. 1966). Trotz guter Trennergebnisse erwiesen sich die als Träger der

stationären Phase dienenden Glaskapillaren als ungünstig. Bei höheren Temperaturen blutet die an der Kapillare anhaftende stationäre Phase stark und die in die stationäre Phase integrierten AS neigen zur Racemisierung (ABE und MUSA 1980).

Um eine gute Enantiomerentrennung auch bei hohen Temperaturen gewährleisten zu können, wurde eine temperaturstabile L-Valin-*tert*-Butylamid/Polysiloxan-Mischphase entwickelt (FRANK et al. 1977; KÖNIG et al. 1981), die sich gegenüber anderen Mischphasen durchgesetzt hat und in den verschiedensten Bereichen zur Erfassung von D-AS zur Anwendung kommt (BAYER et al. 1987). Die unter der Bezeichnung „Chirasil-Val“ bekannte Säule erlaubt die Trennung aller proteinogenen AS mit Ausnahme von DL-Glutamin (DL-Gln) und DL-Asparagin (DL-Asn), die aufgrund der sauer katalysierten Derivatisierung zu flüchtigen Derivaten zu den entsprechenden Säuren Glu bzw. Asp hydrolysiert werden. Die basischen AS Histidin (His), Arginin (Arg) und Tryptophan (Trp) lassen sich, ebenso wie die schwefelhaltige AS Cystein (Cys), nur mit besonderem Aufwand erfassen, so daß zur Bestimmung dieser AS bevorzugt flüssigchromatographische Methoden eingesetzt werden (siehe Kap. 1.5.2.2).

Eine weitere Gruppe chiraler stationärer Phasen stellen die Cyclodextrine dar. Dabei handelt es sich um optisch reine, meist aus D-Glucose aufgebaute zyklische Zuckeroligomere, die je nach Anzahl der Ringglieder (6, 7 oder 8) als  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrine bezeichnet werden (SCHURIG und NOWOTNY 1988; KÖNIG 1992). Aufgrund ihrer polaren Struktur werden die Cyclodextrine vor ihrem Einsatz in der GC durch Alkylierung oder Acylierung in geeigneter Weise modifiziert. Durch die chemische Bindung der Cyclodextrine an Polysiloxangerüste läßt sich zusätzlich eine deutlich höhere Temperaturstabilität der stationären Phase erreichen. Dies ist gleichzeitig verbunden mit geringerem Säulenbluten, besseren Trennfaktoren aufgrund der Erhöhung der Cyclodextrinkonzentration in der stationären Phase und mit der Möglichkeit der Verwendung unpolarer Polysiloxanmatrices, die zu geringeren Retentionszeiten polarer Substanzen führt (JUNG et al. 1994).

Da AS nicht unzersetzt verdampfbar sind, müssen sie zunächst in leichtflüchtige Formen überführt werden. Hier hat sich für die Chromatographie mit Valinamid/Polysiloxan-Phasen die Derivatisierung der AS zu halogenacylierten Alkylestern als besonders geeignet erwiesen (HAUSCH 1990).

Sollte es bei komplexen AS-Gemischen zur Coelution zweier Peaks kommen, lässt sich bei der Wahl eines massensensitiven Detektors im Selected Ion Monitoring (SIM)-Modus trotzdem eine quantitative Bestimmung beider Substanzen bewerkstelligen, sofern die Stoffe unterschiedliche Fragmentierungsmuster aufweisen, indem die Integration der Peakflächen der jeweils charakteristischen Massenspuren getrennt erfolgt (siehe Kap. 2.1).

### 1.5.2.2 Flüssigchromatographische Methoden

Im Gegensatz zur GC haben sich in der HPLC „indirekte“ Methoden als Varianten der achiralen AS-Analytik etabliert, d.h. die Trennung der DL-AS erfolgt an einer nichtchiralen stationären Umkehrphase (RP-18-Phase) nach Derivatisierung mit chiralen Reagenzien, wodurch aus dem ursprünglichen Enantiomerenpaar ein Diastereomerenpaar mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften resultiert. Für viele Anwendungsbereiche komplexer Gesamttrennungen hat sich die Vorsäulenderivatisierung der AS mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) und chiralen Thiolen, wie z.B. *N*-Isobutyrylcystein (BRÜCKNER et al. 1990, 1991; BRÜCKNER et al. 1995), *N*-Acetylcystein (NIMURA und KINOSHITA 1986; BRÜCKNER et al. 1989), *N*-*tert*-Butyloxycarbonylcystein (BUCK und KRUMMEN 1984) oder *N*-Acetyl-L-Penicillamin (BUCK und KRUMMEN 1987) bewährt.

Ist lediglich die Trennung einzelner DL-AS-Paare erforderlich, eignen sich chirale Varianten des Sanger-Reagenzes, wie *N*<sup>2</sup>-(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-alaninamid oder –L-valinamid sehr gut (BRÜCKNER und GAH 1991; BRÜCKNER und KELLER-HOEHL 1990; MARFEY 1984).

Eine „direkte“ chirale Trennung von DL-AS ist in der HPLC entweder durch chirale stationäre Phasen wie Kronenetherphasen (ARMSTRONG et al. 1993b), Cyclodextrinphasen (LI und PURDY 1992) sowie Pirkle-Phasen (PIRKLE und HOUSE 1979) oder durch Ligandenaustauschchromatographie möglich. Bei letzterer werden die underivatisierten DL-AS nach Zusatz optisch reiner Komponenten zur mobilen Phase als diastereomere Komplexe getrennt (DUCHATEAU et al. 1989). Eine Variante stellt die Verwendung einer chiralen stationären Phase dar, z.B. mit L-Pro als chiraalem Selektor, die bei Gebrauch einer Cu(II)-haltigen mobilen Phase



durch Komplexbildung die Enantiomerentrennung ermöglicht (BRÜCKNER 1987; GÜBITZ et al. 1982).

### 1.6 Aufgabenstellung

Mittels der hochempfindlichen und hochspezifischen Methode der Gaschromatographie-Selected Ion Monitoring-Massenspektrometrie (GC-SIM-MS) sollte die enantioselektive Trennung von DL-AS in komplexen Matrices nach Derivatisierung zu den entsprechenden perfluoracylierten Alkylestern optimiert werden. Anschließend sollte anhand verschiedener Lebensmittelgruppen überprüft werden, ob sich die Methode zur Charakterisierung sowie zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle fermentierter Lebensmittel eignet. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollten mögliche Marker-AS für die Reifungszeit bzw. Lagerungsdauer fermentierter Lebensmittel auf ihre Eignung als „Altersindikator“ überprüft werden.

Da bisherige Studien, die sich mit Racemisierungsmechanismen von freien AS beschäftigen, fast ausschließlich unphysiologische bzw. nicht lebensmittelrelevante pH-Bereiche abdecken, sollte weiterhin im Rahmen einer Untersuchung zur Kinetik der AS-Racemisierung in Abhängigkeit von pH-Wert und Zeit ermittelt werden, ob sich signifikant unterschiedliche Racemisierungsverläufe ergäben und welche möglichen Reaktionsmechanismen ursächlich dafür verantwortlich gemacht werden könnten. Im Hinblick auf den Einfluß der Lebensmittelmatrix auf die AS-Racemisierung sollte nachfolgend überprüft werden, ob auch reduzierende Zucker durch die Maillardreaktion, die als nichtenzymatische Bräunung in vielen Lebensmitteln temperatur- und zeitabhängig abläuft, Effekte auf die Bildung von D-AS ausüben.

Im Zuge der immer noch kontrovers geführten Diskussion über die Entstehung potenziell toxischer AS, insbesondere was deren Bildung durch technologische Behandlung von Lebensmitteln betrifft, sollte weiterhin untersucht werden, inwieweit die Erhitzung von Gelatine bzw. Gelatinepartialhydrolysat in haushaltsüblichen Mikrowellengeräten zur Entstehung der erwiesenermaßen antifibrotisch und damit potenziell toxisch wirkenden AS *cis*-4-L-Hyp aus dem nativ in Gelatine enthaltenen *trans*-4-L-Hyp führt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Instrumentelle Anordnung und Systemeinstellungen

#### 2.1.1 Gaschromatograph-Massenspektrometer

Zur Analyse der AS-Derivate wurde ein Gaschromatograph GC 17 A mit Quadrupol-Massenspektrometer QP 5000 und Split/Splitless-Injektor (Shimadzu, Kyoto, Japan) verwendet [A – D]. Die Datenauswertung erfolgte mit der Steuerungs- und Auswertungssoftware Class-5000 für das GC 17A/QP 5000-System von Shimadzu.

#### Systemeinstellungen

Injektor- und Detektortemperatur jeweils	250 °C
Elektronenstoßenergie:	70 eV
Detector Gain:	1,5 kV
Split-Verhältnis bei Injektion:	1:10 bis 1:100
Injektionsvolumen:	0,4 bis 1,5 µl

Druckführung des Trägergases und Temperaturführung des Säulenofens erfolgten wie in [A] beschrieben.

MS-Parameter: Bei der GC-MS-Methode können außer Messungen im Scan-Modus auch Bestimmungen im SIM-Modus durchgeführt werden, bei dem sogenannte Ionsets festgelegt werden. Hierbei werden selektiv innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls nur charakteristische Massenfragmente einzelner AS detektiert, wodurch die Empfindlichkeit deutlich gesteigert wird. Außerdem können störende Peaks, die im Scan-Modus detektiert werden, unterdrückt sowie die anfallende Datenmenge erheblich reduziert werden. Daher wurden in einem Scan-Lauf zunächst Retentionszeiten und charakteristische Fragmentationen der einzelnen AS bestimmt und dementsprechend Gruppen von AS gemäß ihrer Elutionsfolge in Zeitfenstern (Ionsets) zusammengefaßt (siehe Tab. 2-1).

**Tab. 2-1** Charakteristische Massenfragmente ( $m/z$ ) der Pentafluorpropionyl-Derivate der Aminosäure-Enantiomerenpaare mit den zugehörigen Retentionszeiten gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil-L-Val, Retentionszeitspannen entsprechen den gesetzten Zeitfenstern (Ionssets)

Retentionszeit [min]	AS	Massenfragmente ( $m/z$ )
6,00 bis 10,50	DL-Ala	190, 191
10,50 bis 14,70	DL-Val	203, 218
	DL-Thr	202, 203
	DL- <i>allo</i> -Thr	202, 203
	Gly	176, 177
14,70 bis 17,90	DL-Ile	203, 232
	DL- <i>allo</i> -Ile	203, 232
	DL-Pro	216
17,90 bis 22,00	DL-Leu	190, 232
	DL-Ser	188, 189
	L-Nle	176, 190, 232
22,00 bis 23,70	GABA	204, 232, 249
23,70 bis 25,50	<i>trans</i> -4-L-Hyp	94, 96, 214, 215
25,50 bis 27,90	<i>cis</i> -4-D-Hyp	94, 96, 214, 215
	DL-Asp	189, 234, 235, 262
27,90 bis 30,70	DL-Met	203, 221, 263,
30,70 bis 33,00	DL-Phe	91, 148, 190, 266
	DL-Glu	202, 230, 248
33,00 bis 37,50	DL-Tyr	253, 310
37,50 bis 39,50	DL-Orn	216, 217, 261
39,50 bis 42,50	DL-Lys	230

Da sich die Trennleistung der GC-Säule aufgrund des hohen Probendurchsatzes im Laufe der Zeit verschlechterte und sich damit die Retentionszeiten der AS verkürzten, mußten die Zeitfenster im SIM-Modus in der Steuerungssoftware des MS entsprechend angepaßt werden.

Zur Trennung der insgesamt acht verschiedenen Stereoisomere des 3- und 4-Hyp **[B]** wurden aufgrund der in diesem speziellen Fall besseren Trennleistung der stationären Phase die Trifluoracetyl-Hyp-2-Propylester zur Analyse verwendet (siehe Tab. 2-2).

**Tab. 2-2** Retentionszeiten und charakteristische Massenfragmente ( $m/z$ ) der Trifluoracetyl-Hyp-2-Propylester gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil-L-Val

<b>Hydroxyprolin-Stereoisomer</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>	<b>Massenfragmente (<math>m/z</math>)</b>
<i>trans</i> -3-DL-Hyp	19,6 bis 20,2	96, 165, 278
<i>trans</i> -4-DL-Hyp	23,2 bis 24,4	94, 164, 278
<i>cis</i> -3-DL-Hyp	25,3 bis 26,2	96, 165, 278
<i>cis</i> -4-DL-Hyp	26,8 bis 27,7	94, 164, 278

### 2.1.2 Gaschromatograph-Flammenionisationsdetektor

Zur Analyse einiger Proben [D] wurde ein Gaschromatograph GC 14 A mit Flammenionisationsdetektor (FID) und Split/Splitless-Injektor (Shimadzu, Kyoto, Japan) verwendet. Die Datenauswertung erfolgte mittels Integrator C-R3A von Shimadzu.

#### Systemeinstellungen

Injektor- und Detektortemperatur jeweils	250 °C
Signalintensität:	Range 1
Split-Verhältnis bei Injektion:	1:30
Injektionsvolumen:	0,6 bis 1,5 µl

Druckführung des Trägergases und Temperaturführung des Säulenofens erfolgten wie in [D] beschrieben.

### 2.1.3 Gase aus Druckgasflaschen

Helium 5.0 (Reinheit  $\geq 99,9990\%$ ) kam als Trägergas für das GC-MS- und GC-FID-System zum Einsatz. Stickstoff technischer Qualität wurde zur Entfernung von Lösungsmitteln am Gasstrom verwendet. Wasserstoff 5.0 und synthetische Luft wurden zum Betrieb des FID eingesetzt. (alle Gase von *Messer-Griesheim*, D-47793 Krefeld).

### 2.1.4 Trennsäulen

Für beide Systeme wurden Chirasil-L-Val<sup>®</sup>, Fused-Silica-Kapillarsäulen, 25 m x 0,25 mm i.D., stationäre Phase 0,12 µm (Chrompack, Middelburg, Niederlande) verwendet.

### 2.2 Geräte und Hilfsmittel

Die genauen Spezifikationen der in den Publikationen **[A - D]** verwendeten Geräte und Materialien erfolgt jeweils im Material- und Methodenteil der entsprechenden Arbeiten.

### 2.3 Chemikalien

Die genauen Spezifikationen der in den Publikationen **[A - D]** verwendeten Chemikalien erfolgt jeweils im Material- und Methodenteil der entsprechenden Arbeiten.

Der DOWEX 50W X8-Kationenaustauscher wurde vor der Säulenpräparation mit den jeweils fünffachen Bett-Volumina der folgenden Spülflüssigkeiten aktiviert:

1) Bidest. Wasser; 2) 2 M NaOH; 3) Bidest. Wasser; 4) 2 M HCl; 5) Bidest. Wasser.

Das Waschen mit Wasser erfolgte jeweils bis zur annähernden Neutralität des Auslaufes (keine Verfärbung des Universalindikatorpapiers). Die Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt unter 0,1 M HCl.

### 2.4 Probenmaterialien

Essig:

25 Essigproben verschiedener Hersteller und Ausgangsprodukte wurden im regionalen Einzelhandel Gießens erstanden (toom Verbrauchermarkt, Feinkostladen Käseglocke). Die detaillierten Probandaten finden sich in **[A]**.

### Gelatine und Gelatinehydrolysat:

Die Gelatine der Firma Ewald-Werke GmbH & C. KG, D-55560 Sobornheim (reine Typ A-Gelatine, granuliert) wurde im regionalen Einzelhandel erstanden. Das Gelatinehydrolysat (Gelita Sol, gewonnen durch enzymatische Partialhydrolyse, durchschnittliches Molekulargewicht 3000 Da) wurde von der Firma DGF Stoess A.G., D-69412 Eberbach, zur Verfügung gestellt **[B]**.

### Racemisierungsversuche:

Untersucht wurden freie AS in Form des Standardgemisches Standard H (*Pierce*) sowie freie L-Asp (*Fluka*) und ein Rotweinessig, erworben bei toom Verbrauchermarkt, Gießen **[C]**.

### Biere und Bierrohstoffe:

Es wurden 42 Bierproben aus aller Welt untersucht **[D]**. Dabei handelte es sich im einzelnen um 6 belgische Lambic-Biere, 11 Altbier- bzw. Ale-Proben, 11 Weizenbiere (davon 4 Proben Berliner Weisse), 7 Pilsener und Export-(Lager-)Biere, 4 Starkbiere und 3 Schwarzbieren. Die Proben wurden teilweise im regionalen Einzelhandel oder über spezialisierte Importeure bzw. Brauereien beschafft.

Die untersuchten Bierrohstoffe (3 Proben von Hopfendolden, 4 Proben Braugerste, 2 Proben Weizenmalz, 6 Proben helles Gerstenmalz und 1 Probe Gersten-Farbmalt) wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hasan Taschan, Gießen, zur Verfügung gestellt. Die Proben waren nicht näher nach Herkunft, Sorte und Charge definiert.

## **2.4.1 Probenbehandlung**

### Essige

Aliquote der Essige wurden den Handelsflaschen entnommen und der Probenaufarbeitung zugeführt **[A]**. Anschließend wurden die Flaschen verschlossen und unter Lichtausschluß kühl gelagert.

### Gelatine und Gelatinehydrolysat

Es wurden Proben von jeweils 5 g Gelatine bzw. Gelatinehydrolysat in 100 ml bidest. Wasser gelöst und verschiedenen Formen der Erhitzung zugeführt **[B]**.

### Racemisierungsproben

Die Erhitzungsversuche zur Zeit- und pH-abhängigen Racemisierung von AS wurden jeweils in 1 ml Reacti-Vials unter N<sub>2</sub> in einem Thermoblock bei 100 ± 1 °C durchgeführt. Nach definierten Zeitintervallen wurden dann jeweils einzelne Proben entnommen, abgekühlt und weiterbearbeitet **[C]**.

### Biere und Bierrohstoffe

Von den untersuchten Bierproben wurden je ca. 50 ml Aliquote durch ein Faltenfilter filtriert und der Probenaufarbeitung zugeführt **[D]**.

## **2.4.2 Probenaufarbeitung**

Jede Probe der in **[A – D]** beschriebenen Untersuchungen wurde mindestens doppelt aufgearbeitet und derivatisiert. Divergierten die Ergebnisse einer Doppelbestimmung um mehr als 10%, so wurde zur Absicherung der Ergebnisse eine weitere Aufarbeitung mit anschließender Analyse durchgeführt.

## **2.5 Herstellung von Lösungen und Reagenzien**

### Aminosäure-Standardlösungen

Es wurden auf das jeweilige analytische Problem angepasste quantitativ definierte Standardlösungen eingesetzt. Aufgrund der hohen Genauigkeit und der einfachen Handhabung wurde als Ausgangslösung ein kommerzielles äquimolares AS-Gemisch der proteinogenen AS verwendet, der nach Bedarf entsprechende Mengen an internem Standard bzw. anderen AS zugesetzt wurden **[A]**.

Sämtliche Lösungen wurden bei ca. -20°C gelagert; das Verbleiben bei Raumtemperatur wurde auf das nötigste Zeitmaß beschränkt

### Alkohol/HCl-Reagenzien für die Veresterung

Vorgekühltes AcCl wurde tropfenweise zu dem im Eisbad gekühlten und gerührten Alkohol zugesetzt (Verhältnis Alkohol : AcCl = 4:1 (v/v)), wobei aus der Reaktion eine 2,5 N HCl-Lösung im entsprechenden Alkohol resultierte (ZUMWALT et al., 1987).

## **2.6 Derivatisierung der Aminosäuren für die Gaschromatographie**

Die Veresterung der Carboxylgruppe und die Acylierung der Aminogruppe der AS erfolgte je nach analytischer Fragestellung mit unterschiedlichen Alkoholen bzw. Perfluorcarbonsäureanhydriden nach dem in **[A]** beschriebenen Prinzip.

Zur Analyse mittels GC-MS wurden mit Ausnahme der Gelatine-Versuche, wo TFA-AS-2-Propylester zum Einsatz kamen, immer die PFP-AS-2-Propylester verwendet.

Bei der Analyse am GC-FID wurden die TFA-AS-1-Propylester gewählt, da das PFPAA-Reagenz immer mit geringen Anteilen an TFAA verunreinigt ist und sich im GC-FID-System, im Gegensatz zum SIM-Modus der massensensitiven Detektion, störende Peaks nicht ausblenden lassen. Damit wurde die Gefahr von falsch positiven Peakidentifikationen am GC-FID deutlich reduziert.



## 2.7 Mathematische Grundlagen der Auswertung

### 2.7.1 Berechnung der relativen und absoluten Aminosäuregehalte

Relativer D-Aminosäureanteil: 
$$\%D = \frac{A_D}{A_D + A_L} \cdot 100$$

mit  $A_D$  bzw.  $A_L$  als Peakflächen der D- bzw. L-Aminosäurederivate

Quantifizierung der absoluten AS-Gehalte in Essig und Bier:

$$c_{AA} = \frac{A_{AA} \times c_{IS}^* \times f_{dil} \times MW_{AA}}{A_{IS} \times f_R \times 1000}$$

wobei  $c_{AA}$  die Konzentration einer AS in der untersuchten Probe [ $\text{mg l}^{-1}$ ],  $A_{AA}$  die Peakfläche der AS,  $A_{IS}$  die Peakfläche des IS,  $f_R$  den Responsefaktor der AS,  $c_{IS}^*$  die Konzentration des IS [ $\text{mol l}^{-1}$ ],  $f_{dil}$  den Korrekturfaktor für die Verdünnung mit HCl, die zur pH-Einstellung verwendet wurde, und  $MW_{AA}$  das Molekulargewicht der AS [ $\text{g mol}^{-1}$ ] darstellen.

### 2.7.2 Statistische Berechnungen

Arithmetisches Mittel (Mittelwert): 
$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Standardabweichung (Streuung): 
$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) [%]: 
$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

jeweils mit:  $n$  = Zahl aller Messungen;  $x_i$  = einzelne Meßwerte (für die Berechnung der Standardabweichung bzw. des Variationskoeffizienten wurde aufgrund der Rundungsproblematik nicht das ermittelte arithmetische Mittel sondern dessen Berechnungsformel eingesetzt) (SACHS 1984).

Die linearen Regressionsanalysen in **[C]** wurden mittels Microsoft® Excel ausgeführt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die in den Original-Artikeln [A – D] publizierten Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten 3.1 – 3.4 zusammenfassend dargestellt.

#### 3.1 Chirale Aminosäurenanalyse von Speiseessigen mittels Gaschromatographie – Massenspektrometrie

Insgesamt 25 Speiseessige unterschiedlichster Herkunft und Ausgangsmaterialien wurden quantitativ auf ihren Gehalt an freien AS unter Berücksichtigung der Enantiomerenverteilung untersucht [A]. Zur Analyse wurde die hochsensitive Methode der chiralen GC-MS verwendet, wobei die massenspektrometrische Detektion im SIM-Modus erfolgte (siehe Material und Methoden). Die Quantifizierung erfolgte nach der Methode des internen Standards mit L-Nle.

Essige, die aus Traubenmost bzw. Wein hergestellt wurden, enthielten L-Pro als quantitativ bedeutendste AS. Italienische Balsamessige (Aceto balsamico di Modena) enthielten mit einer Ausnahme die höchsten Gesamtmengen an freien L-AS (861-2000 mg/l) und D-AS (46-361 mg/l). Bei diesen Essigen handelt es sich um mehrjährig gereifte Produkte aus konzentriertem Traubenmost (in dieser Arbeit wurden bis zu 25 Jahre alte Essige untersucht, vgl. Tab. 3 in [A]), die aufgrund ihrer Lagerung in offenen Holzfässern einem zusätzlichen Aufkonzentrierungsprozeß unterliegen und daher auch einen sehr hohen Trockenmassegehalt aufweisen (213-386 g/l). Es wurde festgestellt, daß die Gehalte an D-Ala und insbesondere D-Pro mit zunehmendem Alter der Balsamessige anstiegen.

Sherry- und Rotweinessige wiesen im Vergleich mit den Balsamessigen ein sehr ähnliches AS-Muster auf, jedoch lagen die Absolutgehalte der L- und D-AS deutlich niedriger als bei letzteren (220-456 mg/l bzw. 5-19 mg/l). Dagegen lagen die relativen D-AS-Anteile mit Ausnahme des D-Pro in vergleichbaren Bereichen (vgl. Tab. 4 in [A]). Im Gegensatz dazu konnte in Weißwein- und Verschnittessigen, die 25-33% Weinessig und 67-75% Branntweinessig enthielten, kein D-Pro nachgewiesen werden. Des weiteren lagen die absoluten D- und L-AS-Gehalte meist niedriger als in Rotweinessigen. Eine Ausnahme bildeten einige Verschnittessige und auch reine Branntweinessige, die unerwartet hohe Mengen an L-Glu (210-2816 mg/l) enthielten.

In diesen Fällen wurde höchstwahrscheinlich vom Hersteller Mononatriumglutamat als Geschmacksverstärker (E 621) zugesetzt, dies bedingt jedoch die Kenntlichmachung im Zutatenverzeichnis (LEBENSMITTEL-KENNZEICHNUNGS-VERORDNUNG). Allerdings enthielt nur die Zutatenliste eines Produkts einen entsprechenden Eintrag. Mit Ausnahme des L-Glu konnten in reinen Branntweinessigen nur geringe Mengen an L-AS und Spuren an D-AS detektiert werden. Auch Apfelessige wiesen mit 34 bzw. 44 mg/l L-AS und weniger als 2 mg/l D-AS nur unbedeutende AS-Gehalte auf (vgl. Tab. 5 und 6 in [A]).

Die untersuchten Reissessige waren bezüglich ihrer AS-Muster und -Mengen sehr inhomogen. Dies belegen bereits die Spannen von 36-6860 mg/l für freie L-AS und 6-531 mg/l für freie D-AS. Auch die quantitativ bedeutendste AS war in den Proben jeweils verschieden (vgl. Tab. 6 in [A]).

Alle Essige waren als biologisch gewonnen gekennzeichnet, d.h. durch Essigsäuregärung eines alkoholisch vergorenen Naturrohstoffs hergestellt. Die als typische chemische Marker für mikrobielle Tätigkeit angesehenen AS D-Ala, D-Asp und D-Glu konnten auch in allen Proben detektiert werden. Demnach ist die chirale AS-Analytik eine geeignete Methode zur Unterscheidung zwischen Gärungsessig und synthetischem Essig. Weiterhin kann das entsprechende AS-Muster eines Essigs zur Identifikation der zur Fermentation eingesetzten Rohstoffe herangezogen werden. Insbesondere der Gehalt an D-Pro von italienischen Balsamessigen könnte als Reifungs- und Altersindikator für solche Produkte Verwendung finden.

### **3.2 Studien zur optischen Isomerisierung diätetischer Aminosäuren in Essig und wässriger Essigsäure**

Aus den in [A] gewonnenen Ergebnissen und Schlußfolgerungen, sowie zur Überprüfung von in vorangegangenen Studien postulierten Racemisierungsmechanismen von L-Pro (CHIAVARO et al. 1998; CALABRESE und STANCHER 1999; CHAVES DAS NEVES 1990), resultierte im Anschluß eine Studie, die sich mit der zeitabhängigen Racemisierungskinetik diätetischer AS im schwach sauren pH-Bereich, speziell in naturvergorenem Speiseessig (pH 2-3) und in synthetischer,

5%iger wässriger Essigsäure, auseinandersetzte **[C]**. Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Nahrungskomponenten wie Monosaccharide und Metallionen auf die AS-Racemisierung überprüft.

Die Zeitabhängigkeit der AS-Racemisierung wurde bei erhöhter Temperatur (100 °C) durchgeführt, um einen langjährigen Reifungs-/Alterungsprozeß innerhalb weniger Tage simulieren zu können.

Die enantioselektive AS-Analyse wurde mittels chiraler GC-SIM-MS durchgeführt (siehe Material und Methoden). Die für die einzelnen AS-Enantiomere berechneten Peakflächen wurden logarithmisch gegen die Expositionszeit aufgetragen und anhand der Steigung der Regressionsgeraden die Geschwindigkeitskonstanten der Racemisierung der entsprechenden AS ermittelt. Parallel dazu wurden die Racemisierungsraten der AS in 6 M HCl bestimmt und mit den Resultaten aus dem schwach sauren Milieu verglichen (siehe Fig. 1a und 1b, sowie Tab. 2a und 2b in **[C]**).

Es zeigte sich eine starke pH-Abhängigkeit der Racemisierungsraten der AS. In Weinessig und 5%iger Essigsäure nahm die Racemisierungsrate in der Reihenfolge Asp>Ser>Ala>Phe>Lys>Met>Tyr>Glu>Pro>Leu>Val ab. Asp und Ser unterliegen demnach bei pH 2,5 einer deutlich stärkeren Racemisierung als Pro. Somit scheint ein säurekatalysierter Racemisierungsmechanismus für Pro unter diesen Bedingungen nicht relevant zu sein. Im Gegensatz dazu racemisiert Pro verglichen mit anderen AS mit Ausnahme von Asp in 6 M HCl wesentlich schneller. Hier ergab sich folgende Reihenfolge der Racemisierungsgeschwindigkeit: Asp > Pro > Glu > Phe > Met > Lys = Ala > Leu > Ser > Tyr > Val.

Um zu überprüfen, inwieweit andere Nahrungsbestandteile einen Einfluß auf die Racemisierungsrate von L-Pro ausüben, wurde diese AS in einem Modellversuch zusammen mit einer 10%igen Zuckerlösung, bestehend aus gleichen Anteilen  $\beta$ -D-Glucose und  $\beta$ -D-Fructose, in 5%iger Essigsäure erhitzt. In weiteren Ansätzen wurden zusätzlich Kupfer(II)-Ionen bzw. Kupfer(II)-Ionen und Acetoin (2-Hydroxybutan-2-on, eine in Balsamessigen vorkommende Aromakomponente) zugegeben, um mögliche Effekte durch Metallkatalyse oder die Anwesenheit von Hydroxy-/Ketoverbindungen zu erfassen.

Dabei konnte im Verlauf der fortschreitenden Maillard-Reaktion (nichtenzymatische Bräunung), die durch die Reaktion der AS mit reduzierenden Zuckern entsteht, ein deutlicher Anstieg der Pro-Racemisierung (24,2% D-Pro nach 96 h Erhitzung bei 100 °C) detektiert werden. Dagegen zeigten weder Kupfer(II)-Ionen noch Acetoin zusätzliche Effekte [C].

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die hohen relativen Gehalte an D-Pro in Balsamessigen nicht durch säurekatalysierte Racemisierung erklärbar sind. Vielmehr scheint die Maillard-Reaktion von Prolin mit reduzierenden Zuckern, die in Balsamessigen intensiv stattfindet, zu Zwischenprodukten zu führen, die in einer Rückreaktion zur Racemisierung von AS führen. Daneben kommt weiterhin eine enzymatische durch eine mikrobielle Pro-Racemase katalysierte Bildung von D-Pro [A, C, D] in Balsamessigen in Frage.

Die hohen Racemisierungsraten von Asp und Ser bei pH 2,5 lassen sich durch die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrücken-stabilisierten, sp<sup>2</sup>-hybridisierten Übergangszuständen in Form eines Sieben- (Asp) bzw. Sechsrings (Ser) erklären (vgl. Abb. 2a, und 2b in [C]). Diese Übergangszustände werden im Vergleich zu stark sauren Bedingungen (6 M HCl) aufgrund des veränderten Protonierungsgrades der funktionellen Gruppen stabilisiert und erhöhen damit die Racemisierungsanfälligkeit der entsprechenden AS.

### **3.3 Chromatographische Bestimmung von Aminosäuren-enantiomeren in Bieren und Bierrohstoffen**

Unter Verwendung von GC-FID und GC-SIM-MS, ergänzt durch HPLC mit Vorsäulenderivatisierung Fluoreszenzdetektion, wurden 42 Biere aus aller Welt auf ihren Gehalt an freien AS-Enantiomeren hin untersucht. Daneben wurden ebenfalls die entsprechenden Bierrohstoffe Gerste, Gersten- und Weizenmalz, sowie Hopfen analysiert [D]. Ziel der Arbeit war, in Anlehnung an Studie [A], zu überprüfen inwieweit die chirale AS-Analytik zur Charakterisierung von Bieren unterschiedlicher Herstellungsweise, verschiedener Produzenten und/oder ungewöhnlicher Zutaten

geeignet ist. Gleichzeitig sollte der Einfluß der Rohstoffe zum Gehalt an freien AS-Enantiomeren im Endprodukt Bier erfaßt werden.

In Gerste wurden 300-480 mg/kg an freien AS detektiert. Der Anteil an D-AS war mit 1,9-6,6 mg/kg, entsprechend 0,4-1,8%, gering. Malze wiesen dagegen mit Ausnahme von Farbmalz deutlich höhere Gehalte an freien AS auf (2500-3842 mg/kg). Auch der Absolutgehalt an freien D-AS lag höher als bei Rohgerste, der relative Anteil war jedoch vergleichbar dem der Gerste (siehe Tab. 1 in [D]).

Die Erhöhung der Menge an freien AS im Malz ist auf die während des Mälzens erfolgte Aktivierung getreideeigener Exo- und Endopeptidasen zurückzuführen. Der im Vergleich zu hellen Malzen deutlich geringere Gehalt an freien AS von Farbmalz (600 mg/kg) ist dadurch zu begründen, daß durch den intensiven Röstprozeß eine intensive Bildung brauner Maillardprodukte forciert wird und somit freie AS verstärkt abreagieren. Von der Maillard-Reaktion sind D-AS ebenfalls betroffen, womit sich das Nichtvorhandensein von freien D-AS in Farbmalz erklären ließe.

Spuren von D-AS wurden als natürliche Pflanzeninhaltsstoffe identifiziert (BRÜCKNER und WESTHAUSER 1994), so daß die in Gerste detektierten D-AS-Mengen zum einen aus endogener Bildung oder der Aufnahme über die Wurzeln stammen können. Zum anderen ist Getreide nicht steril und damit immer einer gewissen mikrobiellen Besiedlung/Kontamination unterworfen. Mikroorganismen sind potenzielle Quellen für D-AS (SCHLEIFER und KANDLER 1972). Diese Mikroorganismen und deren Racemasen werden beim Weichen und Keimen des Getreides während der Malzproduktion aktiviert und könnten somit Ursache für die Zunahme des D-AS-Gehaltes im Malz sein.

In Hopfen wurden zwar geringe Mengen an D-Asp und D-Glu detektiert, deren Ursprung ebenfalls endogener oder mikrobieller Herkunft sein kann. Aufgrund der geringen Einsatzmenge (0,1-0,5 kg/100 l Würze) ist der Beitrag von Hopfen zum D-AS-Gehalt in Bier jedoch vernachlässigbar.

In allen Bieren wurden die als chemische Marker für mikrobielle Aktivität angesehenen AS D-Ala, D-Asp und D-Glu nachgewiesen. Ausgehend von einem durchschnittlichen Bier mit etwa 12% Stammwürze wird deutlich, daß lediglich ein geringer Anteil an D-AS aus den eingesetzten Rohstoffen stammen kann, wohingegen der Fermentationsprozeß die Hauptmengen an D-AS liefert.

Einzelne Biergruppen zeigten sehr unterschiedliche, jeweils charakteristische AS-Muster. Die höchsten D-AS-Gehalte wurden in Bieren des Typs Berliner Weisse nachgewiesen, deren gemeinsame Eigenschaft in einer zweiten, der alkoholischen Gärung nachgeschalteten, Milchsäuregärung liegt. Unterschiedliche Vorgehensweisen bei der anschließenden Nachvergärung auf der Flasche (Konditionierung) (JACKSON 1994) könnte die Erklärung dafür liefern, warum Berliner Weisse-Biere eines Herstellers neben hohen relativen Gehalten an D-Ala, D-Asp und D-Glu ebenfalls hohe prozentuale Anteile an D-Pro (>20%) aufwiesen (siehe Abb. 3 in [D]), während die Berliner Weisse eines zweiten Herstellers nur Spuren (0,4%) an D-Pro enthielt (Abb. 4 in [D]). Ursache für diesen Befund könnten die beim ersten Hersteller neben den Kräusen bei der Flaschengärung verwendeten Milchsäurebakterien sein, die über eine Pro-Racemase verfügen.

In belgischen Lambic-Bieren wurden neben den typischen Marker-D-AS zusätzlich häufig D-Tyr, D-Ser, D-Lys und/oder D-Arg detektiert. Verantwortlich für das breitere D-AS-Spektrum zeichnet sich vermutlich die bei der Herstellung dieser Biere angewandte Spontangärung mittels eines sehr komplexen Gemisches von verschiedenen Wildhefen und Milchsäurebakterien. Vergleichsweise hohe Gehalte wiesen insbesondere die sogenannten Frucht-Lambics auf, die unter Zusatz frischer Früchte wie Himbeeren, Kirschen oder Pfirsiche, bzw. deren Säfte, hergestellt werden (DE KEERSMAECKER 1996). Bedingt durch den hohen Fruchtanteil (ca. 15%) unterschied sich das AS-Muster dieser Spezialbiere deutlich von dem gewöhnlicher Biere. Während in letzteren L-Pro die quantitativ bedeutendste AS darstellt, verschiebt sich das AS-Muster bei den Frucht-Lambics zugunsten von L-Asp bzw. L-Asn als Haupt-AS. Da mit der gewählten GC-Methode eine Unterscheidung zwischen Asp und Asn aufgrund der sauren Derivatisierungsbedingungen nicht möglich ist, wurde hier zusätzlich eine HPLC-Analyse der AS nach Derivatisierung mit OPA-IBLC bzw. OPA-IBDC durchgeführt. Diese ergab, daß in der Tat L-Asn die quantitativ bedeutendste AS der Frucht-Lambic-Biere ist (vgl. Abb. 5 und 6 in [D]).

Im Gegensatz zu den genannten Spezialbieren wiesen die gewöhnlichen Pilsener, Export- und Altbiere sowie britische Ales und bayerische Weissbiere deutlich geringere absolute und relative D-AS-Gehalte auf, unabhängig davon ob sie mit unter- oder obergäriger Hefe eingebracht wurden. Bezogen auf den Gesamt-AS-

Gehalt lagen die britischen Ales im unteren Bereich (553-785 mg/l), Weizenbiere (560-1080 mg/l) wiesen moderate Mengen auf, Pilsener und Export (1280-2260 mg/l) lagen deutlich höher. Lediglich einige Starkbiere wiesen, bedingt durch ihren hohen Stammwürzegehalt bis zu 5000 mg AS/l auf (vgl. Tab. 1 und 2 in **[D]**).

Damit konnte gezeigt werden, daß die chirale AS-Analytik zur quantitativen Bestimmung von AS-Enantiomeren sehr gut geeignet ist. Die ermittelten AS-Muster, absoluten Mengen und relativen Anteile an AS-Enantiomeren können zur Charakterisierung von Spezialbieren und damit als Indikatoren für Authentizität und Qualität solcher Lebensmittel Verwendung finden.

#### **3.4 Untersuchung zur möglichen Bildung potenziell toxischer Aminosäuren durch die Mikrowellenbehandlung von Speisegelatine**

Wässrige Lösungen (5 g/100 ml) einer kommerziellen Speisegelatine und eines enzymatisch gewonnenen, nicht gelierenden Gelatine-Partialhydrolysats wurden mittels eines haushaltsüblichen Mikrowellengeräts je dreimal bei voller Leistung (750 W) bis zum Sieden erhitzt, wobei die Proben zwischenzeitlich auf Raumtemperatur abkühlen konnten. Gleichartige Probenlösungen wurden parallel dazu über 20 min bei 90 W Leistung in der Mikrowelle erhitzt, um neben dem Temperatureffekt evtl. auftretende intrinsische Mikrowelleneffekte zu erfassen. Zusätzlich wurden zum Vergleich identische Proben auf einer konventionellen Heizplatte erhitzt. Als Kontrolle dienten die nicht erhitzten Gelatine- bzw. Hydrolysatlösungen **[B]**.

Anschließend wurden die unterschiedlich behandelten Proben unter Standardbedingungen (6 M HCl, 110 °C, 24 h) einer Totalhydrolyse unterzogen. Die so erhaltenen freien AS wurden in Form ihrer *N(O)*-Trifluor-AS-2-Propylester gaschromatographisch an Chirasil-L-Val auf die Anwesenheit der acht möglichen Stereoisomeren des Hydroxyprolins (Hyp) hin untersucht (siehe Abb. 1 in **[B]**), dabei galt die besondere Aufmerksamkeit dem als antifibrotisch und damit potenziell toxisch wirkenden Isomer *cis*-4-L-Hyp, über dessen mikrowelleninduzierte Bildung in Fertignahrung für Kleinkinder berichtet worden war (LUBEC et al. 1989).



Neben dem nativ in Gelatine und dem entsprechenden Partialhydrolysat als Hauptkomponente vorliegenden *trans*-4-L-Hyp wurden in allen Proben  $5,0 \pm 0,2\%$  *cis*-4-D-Hyp nachgewiesen. Das antifibrotisch wirksame *cis*-4-L-Hyp wurde in keiner Probe detektiert. Die Entstehung von *cis*-4-D-Hyp trat vollkommen unabhängig von jeglicher Erhitzungsform auch in den nicht erhitzten Kontrollen auf und wurde auf die Totalhydrolyse-bedingte säurekatalysierte Racemisierung von *trans*-4-L-Hyp zurückgeführt.

Eine Mitteilung von LUBEC et al. 1989, in der über die Entstehung des *cis*-L-Hyp bei der Mikrowellenerhitzung von Formula-Diäten für Kleinkinder, welche unter anderem Gelatinehydrolysat enthielten, berichtet wurde, konnte demnach nicht bestätigt werden. Bei der Bildung von ca. 5% *cis*-4-D-Hyp handelt es sich lediglich um ein hydrolysebedingtes Artefakt [B].

#### 3.5 Kritische Beurteilung der Analysenergebnisse

Die für den Großteil der Untersuchungen verwendete Methode der enantioselektiven AS-Analyse mittels GS-MS-Kupplung an der chiralen stationären Phase Chirasil-L-Val unter Detektion charakteristischer Fragmentationen im SIM-Modus und Quantifizierung über den internen Standard L-Nle erwies sich für die entsprechenden Fragestellungen insgesamt als sehr gut geeignet.

Es gilt jedoch festzuhalten, daß bei der Quantifizierung absoluter AS-Gehalte von Lebensmitteln mit komplexer Matrix einige Störeffekte auftreten können. Angefangen bei einer fast immer notwendigen Probenaufarbeitung in Form einer Aufreinigung über Kationentauscher, evtl. mit vorgeschalteten Proteinfällungs- und/oder Entfettungsmaßnahmen bis hin zur Derivatisierung und Injektion der Probe in das Analysensystem kann es zu einer Reihe von AS-Verlusten kommen, die es durch sorgfältigstes Arbeiten zu minimieren gilt. Der interne Standard L-Nle ist zwar weitgehend den gleichen „Verlustreaktionen“ unterworfen wie alle anderen AS, jedoch lassen sich gewisse Abweichungen saurer oder basischer AS nicht ausschließen, so daß es sich hier um eine Kompromißlösung handelt, für die aber

insbesondere ihre Praktikabilität gegenüber der Verwendung mehrerer interner Standards spricht.

Durch die Ermittlung von Responsefaktoren der einzelnen AS in bezug auf den internen Standard (vgl. Tab. 1 in **[A]**) lassen sich bei der Analyse am GC Effekte der thermischen Diskriminierung der AS im Injektorblock ausgleichen. Die Responsefaktoren unterliegen jedoch auch gewissen Schwankungen, was regelmäßige Überprüfungen und Aktualisierungen der Berechnungsformeln notwendig machte.

Die Detektion im SIM-Modus gewährt ein sehr hohes Maß an Sicherheit bei der Peakidentifizierung. Nichtsdestotrotz war eine manuelle Überprüfung der von der Auswertungssoftware gesetzten Peak-Integrationsmarken gerade im Spurenbereich immer erforderlich.

Der Vorteil der SIM-Methode liegt insbesondere darin, daß neben der Retentionszeit ein weiteres Kriterium, nämlich das des Fragmentierungsmusters eines detektierten Peaks zur Identifikation herangezogen werden kann, wobei durch das Ausblenden von evtl. vorhandenen Störfragmenten selbst geringste Mengen der gesuchten Substanz nachweisbar sind. Des weiteren läßt sich selbst bei Coelution zweier AS, sofern sie ein unterschiedliches Fragmentierungsmuster aufweisen, eine Quantifizierung beider AS durchführen, indem eine Integration der einzelnen Massenspuren getrennt erfolgt. Die Gefahr der Ermittlung falsch positiver Ergebnisse ist daher im Vergleich zur HPLC oder GC-FID wesentlich geringer.

Prinzipiell wurde immer versucht, alle AS aus einem GC-Lauf zu bestimmen. Allerdings mußte in einigen Fällen, wie beim Balsamessig, aufgrund des sehr großen Überschusses an einer Haupt-AS (in diesem Falle L-Pro) diese in einem gesonderten Lauf mit höherem Splitverhältnis bei der Probeninjektion quantifiziert werden, da ansonsten die Überladung der Säule eine korrekte Peakauswertung unmöglich gemacht hätte. Das Chromatogramm der Haupt-AS wurde in solchen Fällen als Einschub im Chromatogramm der Gesamttrennung dargestellt (vgl. Abb. 1a, b in **[A]**).

Generell erfolgten alle Quantifizierungen mindestens in Doppelbestimmung, wobei eine methodisch bedingte Abweichung von max. 10% der detektierten Gesamt-AS-

Menge toleriert wurde. Lagen die Abweichungen über dieser Grenze wurde mindestens eine weitere Analyse zur Absicherung der Ergebnisse durchgeführt.

Ein Nachteil der GC-Bestimmung von AS gegenüber der HPLC ist, wie bereits in Kap. 1.5.2.1 beschrieben, die Unmöglichkeit der Unterscheidung zwischen Asn und Asp bzw. Gln und Glu sowie die unter Routinebedingungen nicht analysierbaren AS Arg, His, Trp und Cys. Für den weitaus größten Teil der in den hier dargestellten Studien untersuchten Proben war die Erfassung dieser AS jedoch qualitativ und quantitativ nicht von bedeutendem Interesse. Lediglich für einige der in **[D]** analysierten Spezialbiere konnten durch ergänzende HPLC-Untersuchungen interessante Zusatzinformationen bezüglich der AS-Muster gewonnen werden.

### **3.6 Schlußbetrachtung und Ausblick**

Aus den durchgeführten Studien zur AS-Enantiomerenverteilung in unterschiedlichen Lebensmittelgruppen ergibt sich letztlich die Frage der Aussagekraft der ermittelten Daten bezüglich einer Charakterisierung, bzw. darüber hinaus über Qualität und Authentizität der untersuchten Nahrungsmittel. Die Mechanismen zur Entstehung von D-AS sind vielfältig und daher nur schwierig einer speziellen Ursache zuzuordnen. Dies läßt sich insbesondere am Beispiel der italienischen Balsamessige belegen. Neben dem bedeutenden mikrobiellen Beitrag zum D-AS-Gehalt dieser Produkte scheint zusätzlich, und für bestimmte AS (Pro) möglicherweise hauptsächlich, die während der Produktion und Reifung ablaufende Maillard-Reaktion für die AS-Racemisierung verantwortlich zu sein, während säurekatalysierte Racemisierung der AS nur eine sehr untergeordnete bis vernachlässigbare Rolle spielt. Insgesamt treten mehrere sich überlagernde Faktoren auf, die zusätzlich durch das nichtstandardisierte Produktionsverfahren der Balsamessige zu sehr variierenden Anteilen Einfluß nehmen. Eine genaue Aussage über definierte Reifungszeiten ist demnach bei vollkommen undefinierten Proben nicht möglich, wohl aber eine tendenzielle Einordnung.

Die Differenzierung zwischen synthetischen Produkten und solchen, die durch natürliche mikrobielle Fermentation gewonnen wurden, ist mit Hilfe der chiralen AS-Analytik gut zu treffen.

Bei Produkten wie den Bieren, die unter stark standardisierten Bedingungen hergestellt werden, lassen sich Unterschiede in den Fermentationsbedingungen bzw. den verwendeten Mikroorganismenkulturen anscheinend über das D-AS-Spektrum und die Quantitäten der einzelnen D-AS feststellen. Hier wäre nachfolgend eine systematische Untersuchung der entsprechenden Kulturen auf Racemaseaktivität hin anzustreben, wobei insbesondere Milchsäurebakterien bezüglich einer Pro-Racemase getestet werden sollten, da Evidenz für einen positiven Befund besteht und eine Pro-Racemase bislang nur in Clostridien, die als Schadorganismen gelten, nachgewiesen wurde.

Weiterhin ist von Interesse, wie sich das Racemisierungsverhalten einzelner AS im Verlauf der Maillard-Reaktion verschiedenen Zuckern gegenüber darstellt. Möglicherweise könnten durch gezielte Synthese stabiler Zwischenprodukte der Maillardreaktion und die Erfassung deren Racemisierungsanfälligkeit die Mechanismen der Maillard-Reaktion bedingten AS-Racemisierung aufgeklärt werden.

Aus den vorhergehenden Ausführungen wird deutlich, daß der menschliche Organismus ständig mit D-AS in der Nahrung konfrontiert wird und daß toxische Effekte von D-AS unter realistischen Aufnahmebedingungen auszuschließen sind.

Eine nachgewiesenermaßen antifibrotisch und damit potenziell toxisch wirkende AS ist das *cis*-4-L-Hyp. Gerade deshalb war es wichtig den Befund zu widerlegen, dieses Stereoisomer der natürlicherweise im Bindegewebe vorkommenden AS *trans*-4-L-Hyp entstehe durch haushaltsübliche Erhitzungsmethoden im Mikrowellenherd, wie in einer Mitteilung in einer angesehenen medizinischen Fachzeitschrift beschrieben. Solche Publikationen werden von der nicht wissenschaftlichen Presse ohne kritische Reflexion medienwirksam verbreitet und lösen so massive Verunsicherung beim Verbraucher aus. Daher wird es auch in Zukunft wichtig sein, Ergebnisse wissenschaftlicher Arbeiten mit neuen, modernen Methoden zu überprüfen.

## 4 Zusammenfassung

Es wurden unterschiedliche, durch mikrobielle Fermentation gewonnene, Lebensmittelgruppen qualitativ und quantitativ auf ihren Gehalt an freien D- und L-Aminosäuren (AS) hin untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Überprüfung der erhaltenen AS-Muster in bezug auf ihre Eignung zur Charakterisierung der entsprechenden Nahrungsmittel und in der Evaluierung typischer chemischer Marker-AS, die als Qualitäts- und Authentizitätsindikatoren für bestimmte Produkte zum Einsatz kommen könnten.

Durch die Ermittlung der zeit- und pH-Wert-abhängigen Racemisierungskinetiken einer Vielzahl proteinogener AS in Standardlösungen und in echten Lebensmittelmatrices konnten neue Mechanismen vorgeschlagen werden, die die besondere Anfälligkeit von Asparaginsäure (Asp) und Serin (Ser) bzw. die Unempfindlichkeit von Prolin (Pro) gegenüber der Racemisierung im schwach sauren pH-Bereich (pH 2,5) erklären. Zusätzlich wurden mögliche Auswirkungen der Maillard-Reaktion auf den Racemisierungsgrad bestimmter AS untersucht.

Daneben wurde der Einfluß technologisch bedingter Lebensmittelbehandlung anhand der Mikrowellenerhitzung von Gelatine bzw. Gelatinepartialhydrolysat auf die Bildung der potenziell toxischen AS *cis*-4-Hydroxy-L-Prolin (*cis*-4-L-Hyp) überprüft. Dabei galt es, widersprüchliche Ergebnisse vorangegangener Studien kritisch zu hinterfragen.

Die Aufarbeitung flüssiger Proben (Essig, Bier) erfolgte durch Aufreinigung mittels DOWEX-Kationentauscher. Feste Proben (Getreide, Malz, Hopfen) wurden vermahlen und in 0,1 M Salzsäure (HCl) suspendiert. Anschließend erfolgte eine Entfettung und Proteinfällung mit nachgeschalteter DOWEX-Behandlung. Gelatine bzw. Gelatinepartialhydrolysat wurden einer sauren Totalhydrolyse unter Standardbedingungen (6 M HCl, 110 °C, 24 h) unterzogen.

Die Separation der AS-Enantiomeren in Form unterschiedlicher Perfluoracyl-AS-Alkylester-Derivate wurde mittels Gaschromatographie (GC) an der chiralen stationären Phase Chirasil-L-Val durchgeführt. Als Detektoren kamen vorwiegend ein Selected Ion Monitoring-Massenspektrometer (SIM-MS) und teilweise ein Flammenionisationsdetektor ergänzt durch Hochauflösende Flüssigchromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektor nach Vorsäulenderivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd

und Isobutyryl-D-Cystein bzw. Isobutyryl-L-Cystein (Bier) zum Einsatz. Die Quantifizierung in der GC erfolgte nach der Methode des internen Standards mit L-Norleucin. Bei der HPLC wurde eine Kalibrierung mit externen Standards durchgeführt.

In allen untersuchten fermentierten Lebensmitteln wurden die für mikrobielle Tätigkeit charakteristischen chemischen Marker D-Alanin (D-Ala), D-Asp und D-Glutaminsäure (D-Glu) in teilweise beträchtlichen Mengen detektiert. Demnach fand bei allen Produkten eine echte biologische Gärung statt.

Bei Speiseessigen konnten je nach eingesetzten Rohmaterialien typische AS-Muster ermittelt werden. Bei den italienischen Balsamessigen (Aceto Balsamico di Modena) war mit zunehmendem Alter ein signifikanter Anstieg der relativen und absoluten Gehalte an D-Ala und D-Pro zu verzeichnen. Insbesondere D-Pro könnte als Altersindikator für solche Produkte dienen, die oft einer langjährigen Reifung unterzogen werden. Auch Sherryessige und gereifte Rotweinessige zeigten hohe relative Gehalte an D-AS, der Absolutgehalt lag jedoch deutlich niedriger als bei Balsamessigen. Obstessige und Branntweinessige wiesen lediglich geringe Mengen an Gesamt-AS und Spuren an D-AS auf.

Durch die Erfassung der Racemisierungskinetiken der mittels der verwendeten GC-SIM-MS-Methode bestimmbar proteinogenen AS konnte eine säurekatalysierte Racemisierung von Pro in schwach sauren Lebensmitteln (pH 2-3) als vernachlässigbar gering eingestuft werden.

Die höchste Racemisierungsrate von Asp bei pH 2,5 wurde durch die Ausbildung eines planaren, durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke stabilisierten, Übergangszustandes zwischen  $\beta$ -Carboxylgruppe und  $\alpha$ -Carboxylatgruppe in Form eines siebenatomigen Ringes erklärt. Ein ähnliches Zwischenprodukt wird für Ser postuliert, wo sich vermutlich zwischen dem H-Atom der Hydroxylgruppe und dem negativ geladenen Sauerstoff-Atom der Carboxylatgruppe eine Wasserstoffbrücke unter Entstehung eines Sechsrings ausbildet. Daher ist bei Asp und in geringerem Maße auch bei Ser mit einem gewissen säurekatalysierten Racemisierungsanteil bei schwach sauren Lebensmitteln zu rechnen.

Für Pro konnte eine sehr hohe Racemisierungsrate im Verlauf der beim Erhitzen mit einem Glucose/Fructose-Gemisch zunehmend intensiver werdenden Maillard-

Reaktion ermittelt werden. Diese ist vermutlich für die zeitabhängige Zunahme des Gehaltes der Indikator-AS D-Pro in Balsamessigen verantwortlich.

Die Untersuchung der Biere und Bierrohstoffe ergab, daß der Beitrag der Rohstoffe zu den in Bieren detektierten D-AS vernachlässigbar (Hopfen) bis gering ist (Gerste, Malz). Der Hauptanteil der in den Bieren nachgewiesenen D-AS wurde auf die Aktivität der Racemasen der am Brauprozeß beteiligten Mikroorganismen zurückgeführt. Während gewöhnliche ober- und untergärige Biere wie Alt, Weizen, Pilsener oder Export nur geringe Mengen der typischen Marker D-Ala, D-Asp und D-Glu sowie Spuren von D-Pro enthielten, konnten in Spezialbieren, die unter Verwendung von Milchsäurebakterien (Berliner Weisse) oder Milchsäurebakterien und Wildhefen durch Spontangärung (belgische Lambic-Biere) hergestellt wurden, qualitativ und quantitativ deutlich mehr D-AS detektiert werden. Biere des Typs Berliner Weisse, bei denen die Flaschengärung (Konditionierung) unter Addition von *Lactobacillus delbrueckii* ablief, wiesen mehr als 20% D-Pro auf.

Durch den Einsatz frischer Früchte beim Brauen belgischer Frucht-Lambic Biere ergab sich ein abweichendes AS-Muster im Vergleich zu gewöhnlichen Bieren. Hier konnte durch ergänzende Analysen mittels HPLC L-Asn als Haupt-AS detektiert werden im Gegensatz zu dem in den übrigen Bieren dominanten L-Pro. Starkbiere zeichneten sich aufgrund ihres hohen Stammwürzegehalt zwar durch hohe Absolutgehalte an L- und D-AS aus, die relativen D-AS-Mengen waren jedoch vergleichbar den Bieren Pilsener Brauart. Demnach eignet sich die enantioselektive AS-Analyse insbesondere zur Charakterisierung von Spezialbieren besonderer Produktionsweisen.

Die Erhitzung von Gelatine bzw. Gelatinepartialhydrolysat mittels eines haushaltsüblichen Mikrowellengeräts ergab, daß dabei nicht, wie in der Literatur postuliert, antifibrotisch und damit potenziell toxisch wirkendes *cis*-4-L-Hyp gebildet wird. Die selbst in nicht erhitzten Kontrollen detektierten Mengen von ca. 5% *cis*-4-D-Hyp stellen ein Artefakt dar, welches aus der zur Analyse notwendigen sauren Totalhydrolyse der Proben resultiert. Somit kann die in der Literatur postulierte mögliche Gefährdung des Verbrauchers bezüglich der mikrowelleninduzierten Bildung von toxischem *cis*-4-L-Hyp in gelatinehaltigen Lebensmitteln ausgeschlossen werden.

## 5 Literatur

- ABE I, MUSHA S (1980) Resolution of amino acid enantiomers by glass capillary gas chromatography on easily prepared optically active stationary phases. *J Chromatogr* **200**: 195-199
- ADAMS E (1972) Amino acid racemases and epimerases. In: BOYER PD (ed) *The Enzymes*, Vol VI., Academic Press, New York: 479-507
- ADAMS E, NORTON IL (1964) Purification and properties of inducible hydroxyproline 2-epimerase from *Pseudomonas*. *J Biol Chem* **239**: 1525-1535
- ALBERTINI A, MENTASTI T, MORETTI VM, BELLAGAMBA F, LUZZANA U, VALFRE F (1996) Occurrence of free D-amino acids in milk from food-producing animals. *Milchwiss* **51**: 127-129
- ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986) Energetics and mechanism of proline racemase. *Biochemistry* **25**: 2572-2577
- AMICE M, DELFOUR A, NICOLAS P (1998) Opioid peptides from frog skin. In: JOLLÈS P (ed.) *D-amino acids in sequences of secreted peptides of multicellular organisms*. Birkhäuser, Basel: pp 57-72
- ARMSTRONG DW, GASPER MP, LEE SH, ERCAL N, ZUKOWSKI J (1993a) Factors controlling the level and determination of D-amino acids in the urine and plasma of laboratory rodents. *Amino Acids* **5**: 299-315
- ARMSTRONG DW, GASPER MP, LEE SH, ZUKOWSKI J, ERCAL N (1993b) D-Amino Acid Levels in Human Physiological Fluids. *Chirality* **5**: 375-378
- BADA JL (1972) Kinetics of racemization of amino acids as a function of pH. *J Am Chem Soc* **94**: 1371-1373
- BADA JL (1982) Racemization of amino acids in nature. *Interdis Sci Rev* **7**: 30-46
- BADA JL (1984) *In vivo* racemization in mammalian proteins. *Methods Enzymol* **106**: 98-115
- BADA JL, MACDONALD GD (1995) Amino acid racemization on Mars: Implications for the preservation of biomolecules from an extinct martian biota. *Icarus* **114**: 139-143
- BADA JL, SCHROEDER RA (1975) Amino acid racemization reactions and their geochemical implications. *Naturwiss* **62**: 71-79
- BADA JL, WANG XS., POINAR HN, PÄÄBO S, POINAR GO (1994) Amino acid racemization in amber-entombed insects: Implications for DNA preservation. *Geochim Cosmochim Acta* **58**: 3131-3135
- BADET B, WALSH C (1985) Purification of an alanine racemase from *Streptococcus faecalis* and analysis of its inactivation by (1-aminoethyl)phosphonic acid enantiomers. *Biochemistry* **24**: 1333-1341
- BALAGOT RC, EHRENPREIS S, KUBOTA K, GREENBERG J (1983) Analgesia in mice and humans by D-phenylalanine: relation to inhibition of enkephalin degradation and enkephalin levels. In: BONICA JJ (ed) *Advances in Pain Research and Therapy* **5**: pp 289-293



- BANSI HW, JÜRGENS P, MÜLLER G, ROSTIN M (1964) Der Stoffwechsel bei intravenöser Applikation von Nährlösungen, insbesondere synthetisch zusammengestellter Aminosäurelösungen. *Klin Wochenschr* **42**: 332-352
- BARKER R, HOPKINSON D (1977) The genetic and biochemical properties of the D-amino acid oxidases in human tissues. *Ann Hum Genet* **41**: 27-42
- BAYER E, NICHOLSON G, FRANK H (1987) Separation of amino acid enantiomers using chiral polysiloxanes: quantitative analysis by enantiomer labeling. In: GEHRKE CW, KUO KCT, ZUMWALT RW (eds) Aminoacid analysis by gas chromatography, Vol II, CRC Press, Boca Raton, FL, USA: pp 35-53
- BECKMANN H, LUDOLPH E (1978) DL-Phenylalanin als Antidepressivum. *Arzneim-Forsch/Drug Res* **28**: 1283-1284
- BELASCO JG, ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986a) Energetics of proline racemase: Double fractionation experiment, a test for concertedness and for transition-state dominance. *Biochemistry* **25**: 2552-2558
- BELASCO JG, BRUICE TW, ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986b) Energetics of proline racemase: Fractionation factors for the essential catalytic groups in the enzyme-substrate complexes. *Biochemistry* **25**: 2558-2564
- BELASCO JG, BRUICE TW, FISHER LM, ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986c) Energetics of proline racemase: Rates, fractionation factors, and buffer catalysis in the oversaturated region. Nature of the interconversion of the two forms of free enzyme. *Biochemistry* **25**: 2564-2571
- BENEVENGA NJ, STEELE RD (1984) Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Ann Rev Nutr* **4**: 157-181
- BHATTACHARYYA SK, BANERJEE AB (1969) D-Amino acids in yeast cell pool. *Can J Microbiol* **15**: 1107-1109
- BHATTACHARYYA SK, BANERJEE AB (1974) D-Amino acids in the cell pool of bacteria. *Folia Microbiol* **19**, 43-50
- BISCHOFF R, KOLBE HVJ (1994) Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides: structural determinants and analytical methodology. *J Chromatogr B* **662**: 261-278
- BODANZKY M (1984) Principles of peptide synthesis, reactivity and structure. Concepts in organic chemistry, Vol. 16; Springer, Heidelberg, New York, Tokyo: p. 186
- BOEHM MF, BADA JL (1984) Racemization of aspartic acid and phenylalanine in the sweetener aspartame at 100 °C. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 5263-5266
- BONNER WA (1995) Chirality and life. *Origins Life Evol Biosphere* **25**: 175-190
- BONNER WA (1998) Homochirality and life. In: JOLLÈS P (ed.) D-amino acids in sequences of secreted peptides of multicellular organisms. Birkhäuser, Basel: pp 159-188
- BONNER WA, LEMMON RM (1978) Radiolysis, racemization, and the origin of optical activity. *Bioorg Chem* **7**: 175-187

- BRÜCKNER H (1987) Enantiomeric resolution of *N*-methyl- $\alpha$ -amino acids and  $\alpha$ -alkyl-amino acids by ligand-exchange chromatography. *Chromatographia* **24**, 725-738
- BRÜCKNER H, BECKER D, LÜPKE M (1993) Chirality of amino acids of microorganisms used in food biotechnology. *Chirality* **5**: 385-392
- BRÜCKNER H, GAH C (1991) High-performance liquid chromatographic separation of DL-amino acids derivatized with chiral variants of Sanger's reagent. *J Chromatogr* **555**: 81-95
- BRÜCKNER H, HAASMANN S, FRIEDRICH A (1994) Quantification of D-amino acids in human urine using GC-MS and HPLC. *Amino Acids* **6**: 205-211
- BRÜCKNER H, HAUSCH M (1989a) Detection of Free D-Amino Acids in Food by Chiral Phase Capillary Gas Chromatography. *J High Resol Chromatogr* **12**: 680-684
- BRÜCKNER H, HAUSCH M (1989b) Gas Chromatographic Detection of D-Amino Acids as Common Constituents of Fermented Foods. *Chromatographia* **28**: 487-492
- BRÜCKNER H, HAUSCH M (1990a) D-Amino acids as ubiquitous constituents in fermented foods. In: LUBEC G, ROSENTHAL GA (eds.) *Amino Acids. Chemistry, Biology and Medicine*. Escom, Leiden: pp. 1172-1182
- BRÜCKNER H, HAUSCH M (1990b) D-amino acids in dairy products: Detection, origin and nutritional aspects. I. Milk, fermented milk, fresh cheese and acid curd cheese. *Milchwiss* **45**: 357-360
- BRÜCKNER H, HAUSCH M (1993) Gas chromatographic characterization of free D-amino acids in the blood serum of patients with renal disorders and of healthy volunteers. *J Chromatogr B* **614**: 7-17
- BRÜCKNER H, JAEK P, LANGER M, GODEL H (1992) Liquid chromatographic determination of D-amino acids in cheese and cow milk. Implications of starter cultures, amino acid racemases, and rumen microorganisms on formation, and nutritional considerations. *Amino Acids* **2**: 271-284
- BRÜCKNER H, KELLER-HOEHL C (1990) HPLC Separation of DL-amino-acids derivatized with  $N^2$ -(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-amino acid amides. *Chromatographia* **30**: 621-629
- BRÜCKNER H, LANGER M, LÜPKE M, WESTHAUSER T, GODEL H (1995) Liquid chromatographic determination of amino acid enantiomers by determination with *o*-phthaldialdehyd and chiral thiols - Applications with reference to food science. *J Chromatogr A* **697**: 229-245
- BRÜCKNER H, WESTHAUSER T (1994) Chromatographic Determination of D-Amino Acids as Native Constituents of Vegetables and Fruits. *Chromatographia* **39**: 419-426
- BRÜCKNER H, WITTNER R, GODEL H (1989) Automated enantioseparation of amino acids by derivatization with *o*-phthaldialdehyde and *N*-acylated cysteins. *J Chromatogr* **476**: 73-82
- BRÜCKNER H, WITTNER R, GODEL H (1990) Amino acid analysis by derivatization with *o*-phthaldialdehyde and chiral thiols. In: Lubec, G., Rosenthal, G. A. (eds.) *Amino Acids. Chemistry, Biology and Medicine*. Escom, Leiden, pp. 143-151

- BRÜCKNER H, WITTNER R, GODEL H (1991) Fully Automated High-Performance Liquid Chromatographic Separation of DL-Amino Acids Derivatized with *o*-Phthaldialdehyde together with *N*-Isobutyryl-Cysteine. Application to Food Samples. *Chromatographia* **32**: 383-388
- BUCK RH, KRUMMEN K (1984) Resolution of amino acid enantiomers by high-performance liquid chromatography using automated-pre-column derivatization with a chiral reagent. *J Chromatogr* **315**: 279-285
- BUCK RH, KRUMMEN K (1987) High-performance liquid chromatographic determination of enantiomeric amino acids and amino alcohols after derivatization with *o*-phthaldialdehyde and various chiral mercaptans. Application to peptide hydrolysates. *J Chromatogr* **687**: 255-265
- BYCROFT BW (ed.) (1988) Dictionary of antibiotics and related substances. Chapman and Hall, New York
- CALABRESE M, STANCHER B, RICCOBON P (1995) High-performance liquid chromatography determination of proline isomers in Italian wines. *J Sci Food Agric* **69**: 361-366
- CARDINALE GJ, ABELES RH (1968) Purification and mechanism of action. *Biochemistry* **7**: 3970-3978
- CHAVES DAS NEVES HJ, VASCONCELOS AMP, COSTA ML (1990) Racemization of wine free amino acids as function of bottling age. In: FRANK H, HOLMSTED B, TESTA B (eds) Chirality and biological activity. Alan R. Liss, Inc., New York, pp 137-143
- CHEN S-T, CHIOU S-H, CHU Y-H, WANG K-T (1987) Rapid hydrolysis of proteins and peptides by means of microwave technology and its application to amino acid analysis. *Int J Peptide Protein Res* **30**: 572-576
- CHEN S-T, WU S-H, WANG K-T (1989) Rapid racemization of optically active amino acids by microwave oven-based heating treatment. *Int J Peptide Protein Res* **33**: 73-75
- CHIAVARO E, CALIGIANI A, PALLA G (1998) Chiral indicators of ageing in balsamic vinegars of Modena. *Ital J Food Sci* **4**: 329-337
- CORRIGAN JJ (1969) D-amino acids in animals. *Science* **164**: 142-149
- CORRIGAN JJ, SRINIVASAN NG (1966) The occurrence of certain D-amino acids in insects. *Biochem* **5**: 1185-1190
- CREIGHTON DJ, MURTHY NS (1990) Pyridoxyl phosphate- and pyruvyl-dependent enzymes: Flexible response to different chemical challenges. In: SIGMAN DS, BOYER PD (eds) The enzymes, Vol. XIX: Mechanisms of catalysis, 3. Aufl., Academic Press, San Diego: pp 383-387
- CRONIN JR (1989) Origin of organic compounds in carbonaceous chondrites. *Adv Space Res* **9**: 65-71
- CSAPÓ J, CSAPÓ-KISS Z, NÉMETHY S, FOLESTAD S, TIVESTEN A, MARTIN TG (1994) Age determination based on amino acid racemization: A new possibility. *Amino Acids* **7**: 317-325

- D'ANIELLO A, VETERE A, FISHER GH, CUSANO G, CHAVEZ M, PETRUCELLI L (1992) Presence of D-alanine in proteins of normal and Alzheimer human brain. *Brain Res* **592**: 44-48
- DAVIES JS (1977) Occurrence and biosynthesis of D-amino acids. In: WEINSTEIN B (ed) *Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides, and proteins*. Marcel Dekker, New York, pp 1-28
- DE KEERSMAECKER J (1996) The Mystery of Lambic Beer. *Scientific Am* **275**: 74-80
- DIXON M, KENWORTHY P (1967) D-Aspartate oxidase of kidney. *Biochim Biophys Acta* **146**: 54-76
- DIXON M, KLEPPE K (1965) D-Amino acid oxidase. Specificity, competitive inhibition and reaction sequence. *Biochim Biophys Acta* **96**: 368-382
- DUCHATEAU A, CROMBACH M, KAMPHUIS J, BOESTEN WHJ, SCHOEMAKER HE, MEIJER EM (1989) Determination of the enantiomers of  $\alpha$ -H- $\alpha$ -amino acids,  $\alpha$ -alkyl- $\alpha$ -amino acids and the corresponding acid amides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **471**: 263-270
- DUNGWORTH G (1976) Optical configuration and the racemisation of amino acids in sediments and in fossils – a review. *Chem Geol* **17**: 135-153
- DUNLOP DS, NEIDLE A (1997) The origin and turnover of D-serine in brain. *Biochem Biophys Res Comm* **235**: 26-30
- EKBORG-OTT KH, ARMSTRONG DW (1996) Evaluation of the concentration and enantiomeric purity of selected free amino acids in fermented malt beverages (beers). *Chirality* **8**: 49-57
- ENGEL MH, MACKO SA, SILFER JA (1990) Carbon isotope composition of individual amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* **348**: 47-49
- FAY L, RICHLI U, LIARDON R (1991) Evidence for the absence of amino acid isomerization in microwave-heated milk and infant formulas. *J Agric Food Sci* **39**: 1857-1859
- FEDELE E, BISAGLIA M, RAITERI M (1997) D-serine modulates the NMDA receptor/ nitric oxide/ cGMP pathway in the rat cerebellum during in vivo microdialysis. *Arch Pharmacol* **355**: 43-47
- FISHER E, HELLER B, NACHON M, SPATZ H (1975) Therapy of depression by phenylalanine. *Arzneim Forsch/ Drug Res* **25**: 132
- FISHER GH (1998) Appearance of D-amino acids during aging: D-amino acids in tumor proteins. In: JOLLÈS P (ed.) *D-amino acids in sequences of secreted peptides of multicellular organisms*. Birkhäuser, Basel: pp 109-118
- FISHER GH, D'ANIELLO A, VETERE A, PADULA L, CUSANO GP, MAN EH (1991) Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain. *Brain Res Bull* **26**: 983-985
- FISHER GH, GARCIA NM, PAYAN IL, CADILLA-PEREZRIOS R, SHEREMATA WA, MAN EH (1986) D-aspartic acid in purified myelin and myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Comm* **135**: 683-687

- FISHER GH, TORRES D, BRUNA J, BERGLJUNG C, CERWINSKI S, MARTIN T, GRUNEIRO A, CHOU S-J, MAN EH (1995) Presence of D-aspartate and D-glutamate in tumor proteins. *Cancer Biochem Biophys* **15**: 79-82
- FISHER LM, ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986a) Energetics of proline racemase: Racemization of unlabeled proline in the unsaturated, saturated, and oversaturated regimes. *Biochemistry* **25**: 2529-2537
- FISHER LM, ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986b) Energetics of proline racemase: Tracer perturbation experiments using [<sup>14</sup>C]Proline that measure the interconversion rate of the two forms of free enzyme. *Biochemistry* **25**: 2564-2571
- FISHER LM, BELASCO JG, BRUICE TW, ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986c) Energetics of proline racemase: Transition-state fractionation factors for the two protons involved in the catalytic steps. *Biochemistry* **25**: 2543-2551
- FRAHN JL, ILLMAN RJ (1975) The occurrence of D-alanine and D-alanyl-D-alanine in *Phalaris tuberosa*. *Phytochem* **14**: 1464-1465
- FRANK H, NICHOLSON GJ, BAYER E (1977) Rapid gas chromatographic separation of amino acid enantiomers with a novel chiral stationary phase. *J Chromatogr Sci* **15**: 174-176
- FRANK H, WOIWODE W, NICHOLSON GJ, BAYER E. (1981) Determination of the rate of acidic catalyzed racemization of protein amino acids. *Liebigs Ann Chem*: 354-365
- FRIEDMAN M, LIARDON R (1985) Racemization kinetics of amino acid residues in alkali-treated soybean proteins. *J Agric Food Chem*, **33**: 666-672
- FRIEDMAN M, MASTERS PM (1982) Kinetics of racemization of amino acid residues in casein. *J Food Sci* **47**: 760-764
- FRIEDRICH M (1982) Die intestinale Phase der Peptidabsorption. *Die Nahrung* **26**: 887-901
- FRITSCH W (1990) Mikrobiologie. 1. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Jena: pp 50-54
- FRITZ P, DEHNE LI, ZAGON J, BÖGL KW (1992) Zur Frage der Aminosäureisomerisierung im Mikrowellenfeld, Ergebnisse eines Modellversuches mit Standardlösungen. *Z Ernährungswiss* **31**: 219-224
- FUKUDA M, TOKUMURA A, OGAWA T, SASOKA K (1973) D-Alanine in germinating *pisum sativum* seedlings. *Phytochemistry* **12**: 2593-2595
- GALLO KA, TANNER ME, KNOWLES JR (1993) Mechanism of the reaction catalyzed by glutamate racemase. *Biochemistry* **32**: 3991-3997
- GAMBURG KZ, REKOSLAVSKAYA NI (1991) Formation and functions of D-amino acids in plants. *Sov Plant Physiol* **38**: 904-912
- GANDOLFI I, PALLA GM, MARCHELLI R, DOSSENA A, PUELLI S, SALVADORI C (1994) D-alanine in Fruit Juices: A Molecular Marker of Bacterial Activity, Heat Treatments and Shelf-life. *J Food Sci* **59**: 152-154
- GANDOLFI I, PALLA L, DELPRATO L, DE NISCO F, MARCHELLI R, SALVADORI C (1992) D-Amino Acids in Milk as Related to Heat Treatments and Bacterial Activity. *J Food Sci* **57**:377-379

- GANOTE CE, PETERSON DR, CARONE FA (1974) The nature of D-serine induced nephrotoxicity. *Am J Pathol* **77**: 269-276
- GEIGER T, CLARKE S (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginy and aspartyl residues in peptides. *J Biol Chem* **262**: 785-794
- GIL-AV E, FEIBUSH B, CHARLES-SIGLER R (1966) Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase. *Tetrahedron Lett*: 1009-1015
- GILLARD RD, POLLARD AM, SUTTON PA (1990) An improved method for age at death determination from the measurement of D-aspartic acid in dental collagen. *Archaeometry* **32**: 61-70
- GÜBITZ G, JUFFMANN E, JELLENZ W (1982) Direct separation of amino acid enantiomers by high-performance ligand exchange chromatography on chemically bonded chiral phases. *Chromatographia* **16**: 103-106
- HASHIMOTO A, NISHIKAWA T, OKA T, HAYASHI T, TAKAHASHI K (1993a) Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery. *FEBS* **331**: 4-8
- HASHIMOTO A, NISHIKAWA T, OKA T, TAKAHASHI K (1993b) Endogenous D-serine in rat brain: N-Methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem* **60**: 783-786
- HAUSCH M (1990) Chromatographische Bestimmung von Aminosäureenantiomeren in Lebensmitteln sowie in menschlichem Blutplasma. *Dissertation*, Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim, Stuttgart
- HECK SD, FARACI WS, KELBAUGH PR, SACCOMANO NA, THADEIO PF, VOLKMANN RA (1996) Posttranslational amino acid epimerization: enzyme-catalyzed isomerization of amino acid residues in peptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4036-4039
- HEINE W, DRESCHER U (1975) Vergleichende Untersuchungen zur Utilisation von L- und DL-Aminosäuregemischen bei vollständiger parenteraler Ernährung im Säuglingsalter. *Dtsch Gesundheitswesen* **30**: 1563-1566
- HEINE W, WUTZKE K, DRESCHER U (1983) D-Amino acid utilization in infants measured with the <sup>15</sup>N-tracer technique. *Clin Nutr* **2**: 31-35
- HELLER B, FISCHER E, MARTIN R (1976) Therapeutic Action of D-Phenylalanine in Parkinson's Disease. *Arzneim Forsch/Drug Res* **26**: 577-579
- HILL DW, WALTERS FH, WILSON TD, STUART JD (1979) High performance liquid chromatographic determination of amino acids in the picomole range. *Anal Chem* **51**: 1338-1341
- HILL RL (1965) Hydrolysis of proteins. *Adv Prot Chem* **20**: 37-107
- JACKSON M (1994) Bier international. 1. Aufl., Hallwag Verlag Bern, Stuttgart
- JARRETT HW, COOKSY KD, ELLIS B, ANDERSON JM (1986) The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns. *Anal Biochem* **153**: 189-198
- KALTENBACH JP, GANOTE CH, CARONE FA (1979) Renal tubular necrosis induced by compounds structurally related to D-serine. *Exp Molecul Pathol* **30**: 209-214

- KAMPEL D, KUPFERSCHMIDT R, LUBEC G (1990) Toxicity of D-proline. In: LUBEC G, ROSENTHAL GA (eds) Amino acids. Chemistry, biology and medicine. Escom, Leiden: 1164-1171
- KANDA M, HORI K, KUROTTSU T, MIURA S, SAITO Y (1989) Reaction mechanism of gramicidin S synthetase 1, phenylalanine racemase, of *Bacillus brevis*. *J Biochem* **105**: 653-659
- KERA Y, AOYAMA H, MATSUMURA H, HASEGAWA A, NAGASAKI H, YAMADA R (1995) Presence of free D-glutamate and D-aspartate in rat tissues. *Biochim Biophys Acta* **1243**: 282-286
- KLEINKAUF H (1980) Die Biosynthese von Antibiotica-Peptiden. *Chemie in unserer Zeit* **14**: 105-114
- KLEINKAUF H, VON DÖHREN H (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem* **192**: 1-15
- KÖGL F, ERXLEBEN H (1939) Chemistry of tumors: Etiology of malignant tumors. *J Physiol Chem* **258**: 57-95
- KÖNIG WA (1992) Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins. Hüthig, Heidelberg
- KÖNIG WA, BENECKE I, SIEVERS S (1981) New results in the gas chromatographic separation of enantiomers of hydroxy acids and carbohydrates. *J Chromatogr* **217**: 71-79
- KREBS HA (1948) The D- and L-amino-acid oxidases. *Biochem Soc Symp* **1**: 2-19
- KREIL G (1994a) Peptides containing a D-amino acid from frogs and molluscs. *J Biol Chem* **269**: 10967-10970
- KREIL G (1994b) Conversion of L- to D-amino acids: A posttranslational reaction. *Science* **266**: 996-997
- KUNZ B (1993) Lexikon der Lebensmitteltechnologie. Springer, Berlin, pp 259-260
- KVENVOLDEN KA, LAWLESS J, PONNAMPERUMA C (1971) Nonprotein amino acids in the Murchinson meteorite. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 486-490
- LEBENSMITTEL-KENNZEICHNUNGSVERORDNUNG in der Form vom 6. September 1984 (BGBl. I, S. 1221), letzte Änderung 8. März 1996 (BGBl. I, S.460)
- LEIBACH FH, GANAPATHY V (1996) Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr* **16**: 99-119
- LI S, PURDY WC (1992) Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. *Chem Rev* **92**: 1457-1470
- LIARDON R, HURRELL RF (1983) Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins. *J Agric Food Chem* **31**: 432-437
- LIARDON R, JOST R (1981) Racemization of free and protein-bound amino acids in strong mineral acid. *J Peptide Protein Res* **18**: 500-505
- LUBEC G, WENINGER M, ANDERSON SR (1994) Racemization and oxidation studies of hair protein in the *Homo tirolensis*. *FASEB J* **8**: 1166-1169
- LUBEC G, WOLF C, BARTOSCH B (1989) Aminoacid isomerisation and microwave exposure. *Lancet* **Dec.**: 1392-1393

- LÜPKE M, BRÜCKNER H (1998) Gas chromatographic evaluation of amino acid epimerisation in the course of gelatin manufacturing and processing *Z Lebensm Unters Forsch* **206**: 323-328
- MAN EH, BADA JL (1987) Dietary D-Amino Acids. *Ann Rev Nutr* **7**: 209-225
- MAN EH, FISHER GH, PAYAN IL, CADILLA-PEREZRIOS R, GARCIA NM, CHEMBURKAR R, ARENDS G, FREY WH (1987) D-Aspartate in Human Brain. *J Neurochem* **48**: 510-514
- MANABE H (1985) Occurrence of D-Alanyl-D-alanine in *oryza australiensis*. *Agric Biol Chem* **49**: 1203-1204
- MANNING JM, MOORE S (1968) Determination of D- and L-amino acids by ion exchange chromatography as L-D and L-L dipeptides. *J Biol Chem* **243**: 5591-5597
- MARCHELLI R, DOSSENA A, PALLA G, AUDHUY-PEAUDECERF M, LEFEUVRE S, CARNEVALI P, FREDDI M (1992) D-amino acids in reconstituted infant formula: A comparison between conventional and microwave heating. *J Sci Food Agric* **59**: 217-226
- MARFEY P (1984) Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res Commun* **49**: 591-596
- MARSHALL E (1990) Racemization dating: great expectations. *Science* **247**: 799
- MARTINEZ DEL POZO A, MEROLA M, UENO H, MANNING JM, TANIZAWA K, NISHIMURA K, SODA K (1989) Stereospecificity of reactions catalyzed by bacterial D-amino acid transaminase. *J Biol Chem* **264**: 17784-17789
- MARTINEZ-CARRION M, JENKINS WT (1965) D-alanine-D-glutamate transaminase. *J Biol Chem* **240**: 3538-3546
- MASTERS HELFMAN P (1976) Aspartic acid racemization in dentine as a measure of ageing. *Nature* **262**: 279-281
- MASTERS HELFMAN P, BADA JL (1975) Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 2891-2894
- MASTERS PM (1983) Senile cataracts and aging changes in human proteins. *J Am Geriatrics Soc* **31**: 426-434
- MASTERS PM, BADA JL, ZIGLER JS (1977) Aspartic acid racemization in the human lens during aging and in cataract formation. *Nature* **268**: 71-73
- MASTERS PM, FRIEDMAN M (1979) Racemization of amino acids in alkali-treated food proteins. *J Agric Food Chem* **27**: 507-511
- MATERN U, FESER C, HELLER W (1984) N-Malonyltransferases from Peanut. *Arch Biochem Biophys* **235**: 218-227
- MATERN U, HELLER W, HIMMELSPACH K (1983) Conformational changes of Apigenin 7-O-(6-O-malonylglucoside), a vacuolar pigment from Parsley, with solvent composition and proton concentration. *Eur J Biochem* **133**: 439-448
- MC FADDEN PN, CLARKE S (1982) Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: possible step in the repair of aged membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 2460-2464



- MIGNOGNA G, SIMMACO M, BARRA D (1998) Occurrence and function of D-amino acids-containing peptides and proteins: antimicrobial peptides. In: JOLLÈS P (ed.) D-amino acids in sequences of secreted peptides of multicellular organisms. Birkhäuser, Basel: pp 29-36
- MILLER JA (1950) Do tumor proteins contain D-amino acids? A review of the controversy. *Cancer Res* **10**: 65-72
- MISLOW K (1972) Einführung in die Stereochemie. 1. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim
- MOR A, AMICHE M, NICOLAS P (1992) Enter a new post-translational modification: D-amino acids in gene-encoded peptides. *Trends Biol Sci* **17**: 481-485
- NAGATA Y, BORGHINI M, FISHER GH, D'ANIELLO A (1995) Free D-serine concentration in normal and Alzheimer human brain. *Brain Res Bull* **38**: 181-183
- NAGATA Y, HORIIKE K, MAEDA T (1994) Distribution of free D-serine in vertebrate brains. *Brain Res* **634**: 291-295
- NAGATA Y, MASUI R, AKINO T (1992) The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma. *Experientia* **48**: 986-988
- NEUBERGER A (1948) Stereochemistry of amino acids. In: ANSON ML, EDSALL JT (eds) Advances in protein chemistry, vol. 4, Academic Press, New York, pp 297-383
- NIMURA N, KINOSHITA T (1986) O-Phthaldialdehyde N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis. *J Chromatogr* **352**: 169-177
- NUMOMURA N, SASAKI M (1986) Soy sauce. In: REDDY NR, PIERSON M, SALUNKHE DK: Legume-based fermented foods. CRC Press, Boca Raton, FL (USA): pp 5-40
- O'CONNOR CM, CLARKE S (1983) Methylation of erythrocyte membrane proteins at extracellular and intracellular D-aspartyl sites *in vitro*. *J Biol Chem* **258**: 8485-8492
- O'CONNOR CM, CLARKE S (1984) Carboxyl methylation of cytosolic proteins in intact human erythrocytes. *J Biol Chem* **259**: 2570-2578
- OGAWA T, FUKUDA M, SASAOKA K (1973a) Occurrence of N-malonyl-D-alanine in pea seedlings. *Biochim Biophys Acta* **297**: 60-69
- OGAWA T, FUKUDA M, SASAOKA K (1973b) Occurrence of D-amino acid aminotransferase in pea seedlings. *Biochem Biophys Res Commun* **52**: 998-1002
- OGAWA T, KAWASAKI Y, SASAOKA K (1978) De novo synthesis of D-alanine in germinating *Pisum sativum* seedlings. *Phytochemistry* **17**: 1275-1276
- OHTANI S, YAMAMOTO K (1992) Estimation of age from a tooth by means of racemization of an amino acid, especially aspartic acid – comparison of enamel and dentin. *J Forensic Sci* **37**: 1061-1067
- PALACÍN M, ESTÉVEZ R, BERTRAN J, ZORZANO A (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* **78**: 969-1054
- PAQUET A, CHING-YUNG M (1989) Racemization assessment in alkali treated dietary proteins using high-performance liquid chromatography. *Nutr Res* **9**: 1053-1065

- PAYAN IL, CHOU S-J, FISHER GH, MAN EH, EMORY C, FREY WH (1992) Altered aspartate in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neurochem Res* **17**: 187-191
- PIRKLE WH, HOUSE DW (1979) Chiral high-pressure liquid chromatographic stationary phases. 1. Separation of the enantiomers of sulfoxides, amines, amino acids, alcohols, hydroxy acids, lactones, and mercaptans. *J Org Chem* **44**: 1957-1960
- RAUNIO RP, MUNTER MJ, JAAKKOLA OJ, KARPPINEN JT (1978) D-Amino acids of the amino acid pool and occurrence of racemase and D-amino acid oxidase activities in *Escherichia coli* B. *Folia Microbiol* **23**: 341-348
- REKOSLAVSKAYA NI, GAMBURG KZ (1984) Possible role of *N*-malonyl-D-tryptophan as a source of auxin in plants. *Sov Plant Physiol* **31**: 481-487
- REKOSLAVSKAYA NI, MARKOVA TA, GAMBURG KZ (1988) Appearance of *N*-malonyl-D-tryptophan in excised leaves during wilting. 1. The content of tryptophan and *N*-malonyl-D-tryptophan as affected by water deficit. *J Plant Physiol* **132**: 86-89
- RÉTEY J, ROBINSON A (1982) Stereospecificity in organic chemistry and enzymology. Verlag Chemie, Weinheim: pp 151-153
- ROBINSON T (1976) D-Amino Acids in Higher Plants. *Life Sci* **19**: 1097-1102
- ROGERS HJ (1983) Bacterial cell structure. In: COLE JA, KNOWLES CJ, SCHLESSINGER D. (eds.) Aspects of microbiology Vol. 6. Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd., Wokingham, Berkshire, England: pp 6-27
- ROHER AE, LOWENSON JD, CLARKE S, WOLKOW C, WANG R, COTTER RJ, REARDON IM, ZÜRCHER-NEELY HA, HEINRIKSON RL, BALL MJ, GREENBERG BD (1993) Structural alterations in the peptide backbone of  $\beta$ -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **268**: 3072-3083
- ROTGANS J, WODARZ R, SCHOKNECHT W, DRYSCH K (1983) The determination of amino acid enantiomers in human saliva with Chirasil-Val. *Archs Oral Biol* **28**: 1121-1124
- SACHS L (1984) Angewandte Statistik. 6. Aufl., Springer, Berlin: p 57
- SALAM A (1991) The role of chirality in the origin of life. *J Mol Evol* **33**: 105-113
- SCHELL MJ, BRADY RO, MOLLIVER ME, SNYDER SH (1997a) D-Serine as a neuromodulator: regional and developmental localization in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* **17**: 1604-1615
- SCHELL MJ, COOPER OB, SNYDER SH (1997b) D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2013-2018
- SCHELLENBERGER A (1989) Enzymkatalyse. In: SCHELLENBERGER A (ed) Enzymkatalyse. Einführung in die Chemie, Biochemie, und Technologie der Enzyme. Springer, Berlin: pp 229-233
- SCHIEBER A (1996) Bestimmung von Aminosäureenantiomeren in physiologischen Matrices mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. *Dissertation*, Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim, Stuttgart

- SCHIEBER A, BRÜCKNER H, LING JR (1999) GC-MS analysis of diaminopimelic acid stereoisomers and amino acid enantiomers in rumen bacteria. *Biomed Chromatogr* **13**: 46-50
- SCHIEBER A, BRÜCKNER H, RUPP-CLASSEN M, SPECHT W, NOWITZKI-GRIMM S, CLASSEN HG (1997) Evaluation of D-amino acid levels in rat by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry: no evidence for subacute toxicity of orally fed D-proline and D-aspartic acid. *J Chromatogr B* **691**: 1-12
- SCHLEIFER KH, KANDLER O (1972) Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. *Bacteriol Rev* **36**: 407-477
- SCHURIG V, NOWOTNY H-P (1988) Separation of enantiomers on dilluted permethylated  $\beta$ -cyclodextrin by high resolution gas chromatography. *J Chromatogr* **441**: 155-163
- SHAPIRA R, AUSTIN GE, MIRRA SS (1988a) Neuritic plaque amyloid in Alzheimer's disease is highly racemized. *J Neurochem* **50**: 69-74
- SHAPIRA R, WILKINSON KD, SHAPIRA G (1988b) Racemization of individual aspartate residues in human myelin basic protein. *J Neurochem* **50**: 649-654
- SIEBER R, EBERHARD P, GALLMANN PU (1996) Heat treatment of milk in domestic microwave ovens. *Int Dairy J* **6**: 231-246
- SILBERNAGL S, VÖLKER K, DANTZLER WH (1999) D-serine is rabsorbed in rat renal pars recta. *Am J Physiol – Renal Physiol* **45**: 857-863
- SODA K (1968) Microdetermination of D-amino acids and D-amino acid oxidase activity with 3-Methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal Biochem* **25**: 228-235
- STADTMAN TC, ELLIOT P (1957) Studies on the enzymatic reduction of amino acids. *J Biol Chem* **228**: 983-997
- STEIN T, KLUGE B, VATER J (1995) Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4'-phosphopantetheine. *Biochemistry* **34**: 4633-4642
- STEINBERG SM, MASTERS PM, BADA JL (1984) The racemization of free and peptide-bound serine and aspartic acid at 100 °C as a function of pH: implications for *in vivo* racemization. *Bioorg Chem* **12**: 349-355
- STROUD ED, SMITH GG (1984) A search for D-amino acids in tumor tissue. *Biochem Med* **31**: 254-256
- STRYER L (1990) Biochemie. 5. Aufl., Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Heidelberg
- TRANTER GE (1986) Paritätsverletzung: Ursache der natürlichen Chiralität. *Nachrichten Chemie Tech Lab* **34**: 866-876
- TUREKIAN KK, BADA JL (1972) The dating of fossil bones. In: BISHOP WW, MILLER JA (eds) Calibration of hominoid evolution. Scottish Academic Press, Edinburgh: pp 171-185

VAN HEIJENOORT J (1994) Biosynthesis of the bacterial peptidoglycan unit. In: GHUYSEN JM und HAKENBECK R (eds) Bacterial cell wall. Elsevier, Amsterdam: pp 39-54

VÁRADI M, ADÁNYI N, SZABÓ EE, TRUMMER N (1999) Determination of the ratio of D- and L-amino acids in brewing by an immobilised amino acid oxidase enzyme reactor coupled to amperometric detection. *Biosens Bioelectr* **14**: 335-340

VOLKMANN RA, HECK SD (1998) Biosynthesis of D-amino acid-containing peptides: Exploring the role of peptide isomerases. In: JOLLÈS P (ed.) D-amino acids in sequences of secreted peptides of multicellular organisms. Birkhäuser, Basel: pp 87-105

VOLLHARDT KPC (1988) Organische Chemie. 1. Aufl., VCH, Weinheim: p 152

YAMADA R, NAGASAKI H, WAKABAYASHI Y, IWASHIMA A (1987) Presence of D-aspartate in rat liver and mouse tissues. *Biochim Biophys Acta* **965**: 202-205

YAO T, WASA T (1988) HPLC detection of L- and D-amino acids by use of immobilized enzyme electrodes as detectors. *Anal Chim Acta* **209**: 259-264

YASUDA-KAMATANI Y (1998) Molluscan neuropeptides. In: JOLLÈS P (ed.) D-amino acids in sequences of secreted peptides of multicellular organisms. Birkhäuser, Basel: pp 37-56

ZENK MH, SCHERF H (1963) D-Tryptophan in höheren Pflanzen. *Biochim Biophys Acta* **71**: 737-738

ZENK MH, SCHERF H (1964) Verbreitung der D-Tryptophan-Konjugations-Mechanismen im Pflanzenreich. *Planta* **62**: 350-364

ZUMWALT RW, KUO KCT, GEHRKE CW (eds) (1987) Amino acid analysis by gas chromatography, Vol. I-III. CRC Press, Boca Raton, FL, USA

## 6 Anhang

- [A]** Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography -  
selected ion monitoring mass spectrometry.....69 - 78
- [B]** Microwave treatment of dietary gelatin does not generate  
*cis*-4-hydroxy-L-proline, an inhibitor of collagen biosynthesis.....79 - 83
- [C]** Racemization kinetics of dietary amino acids in vinegar and  
aqueous acetic acid.....84 - 95
- [D]** Chromatographic determination of amino acid enantiomers in  
beers and raw materials used for manufacturing.....96 - 108



## ORIGINAL PAPER

T. Erbe · H. Brückner

**Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography – selected ion monitoring mass spectrometry**

Received: 11 December 1997 / Revised version: 12 May 1998

**Abstract** Twenty-five vinegars were examined quantitatively for their content of free amino acid (AA) enantiomers using chiral gas chromatography/mass spectrometry. Vinegars manufactured from grape must contained L-proline (L-Pro) as the major AA. Balsamic vinegars (aceto balsamico di Modena), with one exception, contained the highest amounts of L-AAs (861–2000 mg l<sup>-1</sup>) as well as D-AAs (46–361 mg l<sup>-1</sup>). The amounts of D-Pro and D-alanine (D-Ala) increased in the course of maturation. Sherry vinegars had a AA pattern similar to that of balsamic vinegars but with much lower amounts: concentrations of L-AAs were 244 mg l<sup>-1</sup> and 456 mg l<sup>-1</sup> and of D-AAs were 18 mg l<sup>-1</sup> and 19 mg l<sup>-1</sup>. The L-AA content of cider vinegars was very low (34 mg l<sup>-1</sup> and 44 mg l<sup>-1</sup>) and only traces of D-AAs (<2 mg l<sup>-1</sup>) were found. In spirit vinegars few D-AAs and low amounts of most L-AAs were detected, with the exception of L-glutamic acid (L-Glu) (210–847 mg l<sup>-1</sup>), probably added as a flavour enhancer. The AA content of spirit vinegars blended with wine vinegar was influenced by the portion of wine vinegar added. Rice vinegars had concentrations of L-AAs from as low as 36 mg l<sup>-1</sup> to as high as 6860 mg l<sup>-1</sup>, and the concentrations of D-AAs ranged from 6 mg l<sup>-1</sup> to 531 mg l<sup>-1</sup>. All vinegars declared as “produced by microbial fermentation” contained D-Ala, D-aspartic acid, and D-Glu as typical bacterial markers. From the data it is concluded that chiral AA analysis can be used to distinguish among fermented and synthetic vinegars

and to identify raw materials used for their production. In particular, the amount of D-Pro can be used as proof of the maturation process of balsamic vinegar.

**Key words** D-Amino acids · Chemical markers · Acetic fermentation · Aceto balsamico · Authenticity control

**Introduction**

According to the legal definition of the European Union, the term vinegar describes a product that is produced by double fermentation, i.e. alcoholic and acetic, from substances of agricultural origin. Raw materials such as wine, cider, malt, rice mash, whey, concentrated grape must and various kinds of spirits are utilized. In the United States, synthetically produced alcohol diluted with water may also be used [1]. In Germany and Austria, however, a product manufactured by dilution of acetic acid with water, or one obtained by blending fermentation vinegar with synthetic acetic acid or with vinegar made from synthetic acetic acid also is defined as vinegar [2]. In contrast, in most other European countries the term vinegar is prohibited for chemically produced and diluted acetic acid. In Italy and Spain the name vinegar is restricted to that produced from wine by acetic fermentation [3].

A special group of vinegars are the balsamic vinegars from the Modena region in Italy. Authentic products are exclusively produced from the concentrated must of trebbiano or other local grapes. There are two different kinds of balsamic vinegars: the so-called “aceto balsamico tradizionale di Modena” (ABTM) and the “aceto balsamico di Modena” (ABM). According to Italian legislation, ABTM is not considered as a vinegar but as a matured seasoning, whereas ABM as a result of its standardized production is defined as a special commercialized vinegar [4, 5]. The addition of wine vinegar to ABM during its manufacture is allowed, but blending of ABTM is prohibited.

Parts of the results were presented at the 34th Wissenschaftlicher Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, 13–14 March 1997, Freising-Weihenstephan, Germany, and at Euro Food Chem IX, 24–26 September 1997, Interlaken, Switzerland.

T. Erbe · H. Brückner (✉)  
Institute of Nutritional Science, Department of Food Sciences,  
Südanlage 6, D-35390 Giessen, Germany  
e-mail: Hans.Brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de

The production of ABM involves a two-step fermentation process (alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* followed by acetic fermentation with *Acetobacter* spp.), whereas in ABTM slow alcoholic and acetic fermentation take place together, due to the activity of *Zygosaccharomyces* sp. and *A. aceti*, *A. xylinum* and *A. pasteurianus* [4].

During maturation balsamic vinegar is stored in barrels of decreasing capacity made from different types of wood. As a result of continuous evaporation the yield of this highly specialized process is very low, i.e. 1–2 litres of balsamic vinegar from 100 kg of fresh grape must [1, 6]. Therefore, the product is costly and might be subject to illegal blending and adulteration.

Attempts have been undertaken to characterize the quality of vinegar and its origin by analysis of compounds such as monosaccharides together with measurements of its alcohol content [6], concentration of polyphenols [7, 8], amount and composition of volatiles [9], and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -isotope ratio of acetic acid [10].

Conventional amino acid analysis (AA) by paper chromatography has also been used to distinguish between vinegars produced by microbial fermentation and those obtained by dilution of synthetic acetic acid [11–13]. The methods applied, however, did not distinguish between AA enantiomers.

It has been shown that during fermentation of food and beverages D-AAAs are generated by the action of bacterial racemases on L-AAAs and by autolysis of bacteria which contain free D-AAAs in their cytoplasm as well as peptide-bonded D-AAAs in their cell wall peptidoglycan [14]. Therefore, it has been suggested that D-AAAs in food can be used as chemical markers indicating the presence and activity of bacteria [15–16]. Using gas chromatography (GC) on chiral stationary phases or high-performance liquid chromatography together with chiral derivatization reagents, we investigated some vinegars, including a balsamic vinegar, for the presence of L- and D-AAAs before [17–19]. In extending this work we have now systematically investigated 25 vinegars for the presence of AA enantiomers using GC on a chiral stationary phase coupled with selected ion monitoring mass spectrometry.

## Materials and methods

### Capillary GC/mass spectrometry

A Shimadzu GC-17 A gas chromatograph coupled with a Shimadzu QP-5000 mass spectrometer (MS; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was used. An electron acceleration energy of 70 eV was selected for ionization. GC/MS control and data processing were performed by a Shimadzu class 5000 workstation and software.

The column used for separation of AA enantiomers was a fused silica Chirasil-L-Val capillary column (25 m × 0.25 mm ID; Chrompack, Middelburg, The Netherlands). The carrier gas was helium at an inlet pressure of 80 kPa (flow rate 0.7 ml min<sup>-1</sup>). The temperatures of the injector and the interface were 250 °C; samples were injected in split mode (split ratio 1:30 to 1:50). The temperature program was: initial temperature 70 °C held for

8.5 min; heating rate A, 2.5 °C min<sup>-1</sup> to 100 °C; rate B, 3.5 °C min<sup>-1</sup> to 145 °C; rate C, 6.5 °C min<sup>-1</sup> to 190 °C held for 9 min. The pressure program was: initial pressure 5.0 kPa held for 8.5 min; increased at 0.2 kPa min<sup>-1</sup> up to 7.2 kPa; increased at 0.3 kPa min<sup>-1</sup> up to 11.5 kPa; increased at 0.7 kPa min<sup>-1</sup> up to 15.0 kPa, held for 9.7 min.

### Chemicals, solvents and sample materials

**Chemicals.** Dichloromethane (DCM), 2-propanol (2-PrpOH), acetyl chloride (AcCl), 32% aqueous hydrochloric acid (HCl) (all from Merck, Darmstadt, Germany), 25% aqueous ammonia (NH<sub>3</sub>), methanol (MeOH), 100% acetic acid (all from Roth, Karlsruhe, Germany), pentafluoropropionic acid anhydride (PFPA), 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT all from Fluka, Buchs, Switzerland), cation exchanger Dowex 50 W X8 (particle size 0.037–0.075 mm, 200–400 mesh, H<sup>+</sup>-form; Fluka). All chemicals and solvents were of analytical grade.

**Standards.** AA Standard H (Pierce, Rockford, Ill., USA) consisting of Gly and the L-enantiomers of Ala, Val, Thr, Ile, Pro, Ser, Leu, Asp, Met, Glu, Phe, Tyr, Lys, Trp, Arg, His (2.5 mM each) and L-Cys (1.25 mM). AAs are abbreviated according to three-letter nomenclature (see Table 1 for abbreviations); special AAs are abbreviated as follows: pipelicolic acid (Pip),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), ornithine (Orn; all from Fluka); L-norleucine (L-Nle; Merck) was used as the internal standard (IS).

**Sources of vinegars.** Bottled vinegars were purchased in local retail outlets. For specification of vinegars see Table 2. Synthetic vinegar was obtained by dilution of 100% acetic acid with doubly distilled water up to a concentration of 5% acetic acid.

### Isolation of AAs and derivatization procedures

Aliquots (1–5 ml) of the vinegars were adjusted to pH 2.3 by addition of 1 M HCl. As the IS, L-Nle (100  $\mu$ l of a 10 mM solution in

**Table 1** Response factors ( $f_R$ ) and SDs of amino acids (AAs) relative to the internal standard L-norleucine. Recoveries (RC) and limits of quantitative determination (LQD) for AAs according to conditions of sample preparation (see Materials and methods). Ala Alanine, Val valine, Thr threonine, Gly glycine, Pro proline, Ile isoleucine, Leu leucine, Ser serine, Pip pipelicolic acid, GABA  $\gamma$ -aminobutyric acid, Asp aspartic acid, Met methionine, Phe phenylalanine, Glu glutamic acid, Tyr tyrosine, Orn ornithine, Lys lysine

AA	$f_R$ ( $n=5$ )	SD	RC (%)	LQD (mg/l)
Ala	0.76	0.02	98.9	0.06
Val	0.60	0.01	98.7	0.13
Thr	1.06	0.02	89.6	0.08
Gly	0.83	0.01	98.1	0.13
Pro	1.45	0.03	95.2	0.07
Ile	0.54	0.01	97.9	0.22
Leu	0.97	0.01	102.4	0.12
Ser	1.05	0.01	101.3	0.11
Pip	1.12	0.04	91.2	0.09
GABA	0.48	0.03	97.3	0.15
Asp	0.68	0.01	90.7	0.10
Met	0.36	0.02	97.3	0.39
Phe	4.08	0.04	107.7	0.03
Glu	1.18	0.03	96.5	0.15
Tyr	0.93	0.04	90.9	0.18
Orn	0.98	0.07	99.7	0.27
Lys	1.40	0.03	91.2	0.10



**Table 2** Characterization of vinegars investigated

No.	Vinegar <sup>a</sup>	Country of origin	Content of acetic acid (%)	pH	DM <sup>b</sup> (g/l)	Density <sup>c</sup> (g/ml)
1	Aceto balsamico di Modena (no age given)	Italy	6	3.14	213.1	1.115
2	Aceto balsamico (matured for 5 years)	Italy	6	3.04	277.0	1.084
3	Aceto balsamico (matured for 10 years)	Italy	6	3.08	294.6	1.099
4	Aceto balsamico (matured for 12 years in oak, chestnut and cherry wood barrels)	Italy	6	2.94	339.6	1.153
5	Aceto balsamico (matured for 12 years)	Italy	6	3.00	282.6	1.097
6	Aceto balsamico (matured for 25 years)	Italy	6	2.87	386.0	1.196
7	Red wine vinegar (matured for 7 years)	France	7	2.82	9.4	1.032
8	Red wine vinegar (matured for 9 years)	Germany	7	2.80	11.4	1.017
9	Red wine vinegar (with natural extracts of shallots)	Germany	6	2.72	10.2	1.016
10	Red wine vinegar (of Bordeaux grapes)	France	6	2.94	9.7	1.015
11	Red wine vinegar (with raspberry flavour)	France	7	2.81	10.4	1.012
12	Sherry vinegar	Spain	6	2.98	11.5	1.019
13	Sherry vinegar (matured for 12 years)	Spain	6	2.87	11.0	1.009
14	White wine vinegar (with extracts of walnuts)	Germany	6	2.74	8.2	1.012
15	White wine vinegar (with tarragon extract)	Germany	6	2.80	9.1	1.013
16	Spirit vinegar (with extracts of herbs)	Germany	6	2.75	4.7	1.010
17	Spirit vinegar (coloured with caramel)	Germany	5	2.53	3.9	1.008
18	Wine/spirit vinegar (1:3, with extracts of herbs, coloured with caramel)	Germany	5	2.48	4.8	1.011
19	Wine/spirit vinegar (1:3, coloured with caramel)	Germany	5	2.52	4.2	1.009
20	Wine/spirit vinegar (1:2, with extracts of herbs, salted, coloured with caramel)	Germany	5	2.84	40.3	1.034
21	Cider vinegar	Germany	5	3.14	11.6	1.012
22	Cider vinegar	Germany	5	3.08	11.3	1.011
23	Rice vinegar (salted)	China	5	3.50	122.8	1.046
24	Rice vinegar (sweetened)	China	5	3.59	206.3	1.078
25	Rice vinegar	China	5	2.54	2.5	1.003

<sup>a</sup> Samples 1–6 belong to the aceto balsamico di Modena type of balsamic vinegar

<sup>c</sup> Measured by gravimetric analysis

<sup>b</sup> DM dry matter obtained by evaporation of aliquots (5–10 ml) under reduced pressure subsequent dried at 110 °C

0.01 M HCl) was added for quantification. Samples were passed through a column packed with Dowex 50 W X8 cation exchanger (bed volume: 4 cm length × 0.5 cm diameter). After washing with doubly distilled water, the AAs adsorbed were eluted with 4 M aqueous NH<sub>3</sub>. The eluate was removed by evaporation in vacuo (bath temperature ca. 40 °C).

For conversion into their *N*(*O*)-pentafluoropropionyl 2-propyl esters, AAs were dissolved in 0.1 M HCl and transferred into 1 ml Reacti Vials (Wheaton, Millville, N.J., USA). HCl was removed in a stream of nitrogen (N), the antioxidant BHT (10 µl of a solution of 10 mg ml<sup>-1</sup> in 2-PrpOH) and a mixture of 2-PrpOH/AcCl (4:1, v/v; 500 µl) were added and the tightly closed vials were heated at 100 °C for 1 h. The solvents were removed in a stream of N, DCM (200 µl) and PFPA (50 µl) were added and the mixture was heated at 100 °C for 20 min. Reagents were removed in a stream of N, the residue was dissolved in DCM (200 µl) and portions of 0.6–1.0 µl were subjected to GC/MS as described above.

#### Quantification of AAs

The quantification response factors of AAs were determined in relation to L-Nle. Equimolar amounts of AAs including the IS were injected into the GC/MS system. Response factors were calculated according to the equation

$$f_R = A_{AA}/A_{IS},$$

where  $f_R$  is the response factor of AA to be determined,  $A_{AA}$  the peak area of AA to be determined, and  $A_{IS}$  the peak area of IS.

Response factors for AAs investigated are presented in Table 1.

Amounts of AA in vinegars were calculated according to the equation

$$c_{AA} = \frac{A_{AA} \times c_{IS}^* \times f_{dil} \times MW_{AA}}{A_{IS} \times f_R \times 1000}$$

where  $c_{AA}$  is the concentration of an AA in the sample (mg l<sup>-1</sup>),  $c_{IS}^*$  the concentration of IS (mol l<sup>-1</sup>),  $f_{dil}$  the correction factor for dilution with HCl used for pH adjusting, and  $MW_{AA}$  the molecular weight of the AA (g mol<sup>-1</sup>).

Relative amounts of D-AAs were calculated according to the equation

$$\%D = 100 \times A_D / (A_D + A_L),$$

where %D is the relative amount of the D-enantiomer, and  $A_D$  and  $A_L$  are the peak areas of the D- or L-enantiomer, respectively.

For the determination of recoveries of AAs following the ion-exchange procedure (see Materials and methods) a synthetic vinegar was spiked with AA standard H. AAs not included in this standard (Orn, Pip and GABA) were added to provide a 2.5 mM solution. Recoveries (%) and limits of quantitative determination (mg l<sup>-1</sup>) of AAs determined according to the conditions of sample preparation (see Materials and methods) are also summarized in Table 1.

For repeatability tests, one sample was prepared and analyzed in triplicate. Relative standard deviations were: <4.0% for Ala, Gly, Thr, Pro, Ile, Pip, Ser, GABA, Asp and Glu; 5.3–7.7% for Val, Leu, Met and Lys; and 8.9–13.2% for Phe, Tyr and Orn.

Due to derivatization conditions, asparagine and glutamine, if present, are converted into Asp and Glu, respectively. Hence, the calculated amounts of Asp and Glu represent the sum of acid and acid amide. Amounts of histidine, tryptophan, cysteine and arginine could not be determined satisfactorily under the routine derivatization conditions described.

Data are the average of the results of two parallel preparation and derivatization procedures within a range of less than 10% deviation of the absolute total AA amount.

## Results

The presence of L- and D-AAAs was detected in all vinegars. Their pattern and amounts were strongly dependent on the origin of the vinegars and raw materials used for their production. L-Pip was detected in all samples except those of the spirit vinegars (samples 16 and 17) and highest amounts were found in ABM. D-Pip was not detected. Quantitative data of the 25 vinegars are presented and discussed in the following sections.

### Balsamic vinegars

Among vinegars produced from grapes and fruits, highest amounts of L-AAAs were detected in balsamic vinegars. L-Pro was the most abundant AA (Table 3).

All balsamic vinegars showed significant amounts of D-Leu, D-Phe, D-Tyr, D-Orn, and D-Lys and most of them also contained D-Val and D-Ser.

In balsamic vinegars of different origin but of defined age (matured for 5–25 years according to manu-

facturers' declarations) the amounts of D-Ala and D-Pro increased notably in the course of maturation. Simultaneously, dry matter and density increased with ageing and were highest among all samples of balsamic vinegar 6. This vinegar, matured for 25 years, had a dry matter content of 386 g l<sup>-1</sup> and a density of 1.196 g ml<sup>-1</sup>. Highest relative amounts of D-Pro as well as of D-Ala, D-Asp and D-Glu, were also detected in vinegar 6. Sample 3, labeled as matured for 12 years, showed a low D/L-Pro ratio in comparison to other balsamic vinegars of comparable age. Its relative amount of D-Pro was only 3.2%.

In Fig. 1 the chromatograms of two balsamic vinegars, matured for five years (sample 2) and 25 years (sample 6) are presented. Comparison of these chromatograms illustrates the considerable increase in the D/L ratios in the course of maturation.

### Red wine vinegars and sherry vinegars

In comparison to balsamic vinegars, red wine vinegars and sherry vinegars contained much lower amounts of both L-AAAs and D-AAAs (Table 4) as well as having much lower dry matter contents and far lower densities (see Table 2). Again, L-Pro was the most abundant AA (56–203 mg l<sup>-1</sup>). D-Ala, D-Asp and D-Glu were detected in all red wine and sherry vinegars examined. Highest relative amounts of D-AAAs were detected in sherry vinegar 12 (30.3% D-Ala, 20.2% D-Asp and 15.3% D-Glu). Besides those D-AAAs that are typical for

**Table 3** AAAs in balsamic vinegars; arginine, histidine, tryptophan and cysteine were non-detectable. For abbreviations, see Table 1

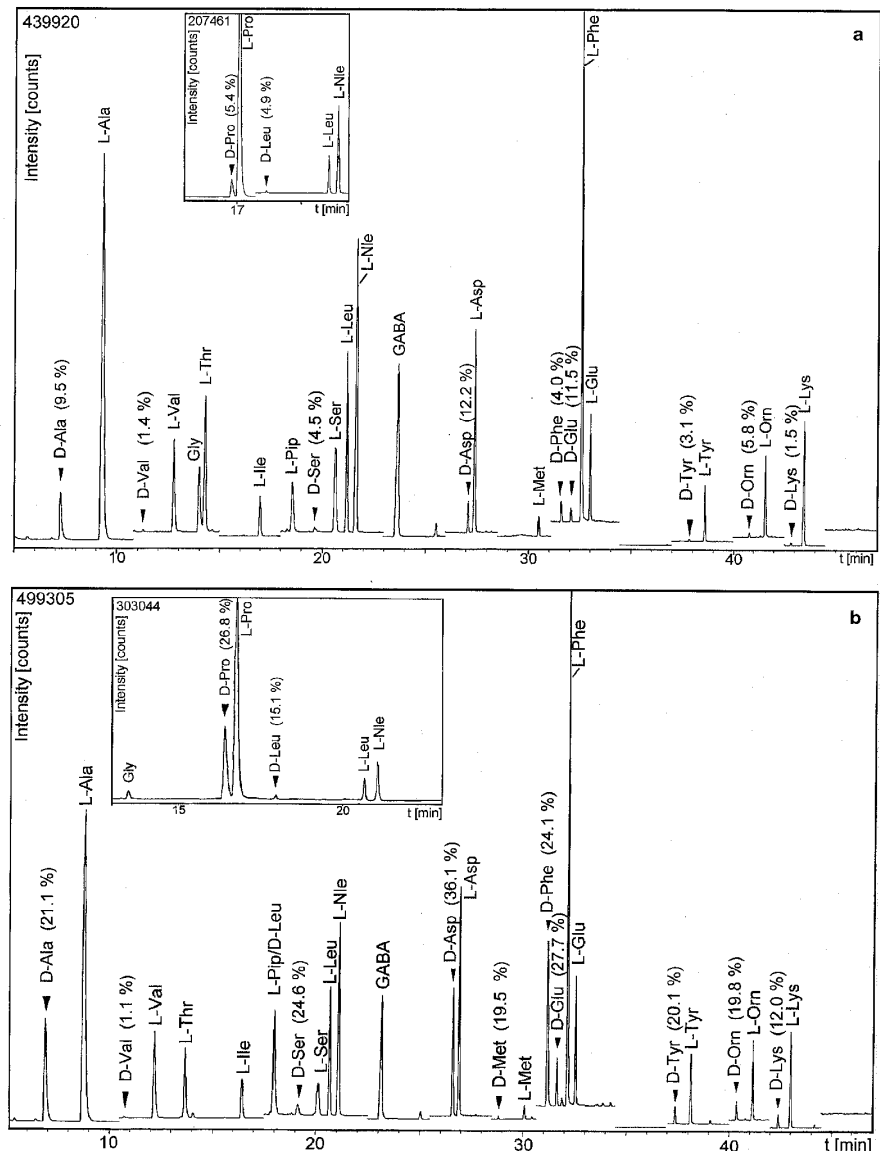
No.	1			2			3			4			5			6		
Age	Several years			5 Years			10 Years			12 years			12 Years			25 Years		
	Amount			Amount			Amount			Amount			Amount			Amount		
AA <sup>a</sup>	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)
Ala	179.0	11.1	5.8	94.1	9.5	9.1	182.4	15.3	7.7	82.9	4.4	5.0	129.8	16.6	11.3	158.9	40.2	20.2
Val	73.9	0.8	1.1	34.2	0.5	1.4	68.7	0.5	0.7	27.1	0	–	41.4	0	–	67.4	0.9	1.3
Thr	72.1	0	–	30.2	0	–	54.1	0	–	32.3	0	–	29.4	0	–	31.5	0	–
Gly <sup>b</sup>	67.2	–	–	26.4	–	–	41.0	–	–	15.3	–	–	19.3	–	–	39.9	–	–
Ile	46.1	0	–	19.6	0	–	40.6	0	–	14.5	0	–	26.8	0	–	42.9	0	–
Pro	579.0	10.4	1.8	307.4	18.9	5.8	653.6	30.8	4.5	916.9	30.6	3.2	451.0	51.6	10.3	542.5	191.9	26.1
Pip	1.1	0	–	14.0	0	–	24.6	0	–	18.8	0	–	17.3	0	–	53.5	0	–
Leu	97.1	1.6	1.7	41.6	2.1	4.7	72.7	2.2	2.9	73.2	1.7	2.3	38.2	0.4	1.0	53.6	9.6	15.2
Ser	95.4	0	–	33.0	1.5	4.5	72.7	1.5	3.8	72.1	1.5	2.0	20.9	2.0	8.7	24.3	8.1	25.0
GABA <sup>b</sup>	133.2	–	–	82.9	–	–	115.5	–	–	151.9	–	–	64.8	–	–	90.5	–	–
Asp	105.9	5.0	4.5	39.0	5.4	12.1	79.4	8.7	9.9	66.7	5.6	7.8	45.6	8.9	16.4	76.2	41.6	35.3
Met	48.3	0	–	12.7	0	–	20.3	0	–	24.9	0	–	5.4	0	–	15.7	3.8	19.5
Phe	85.3	1.1	1.3	29.7	1.3	4.0	49.2	1.9	3.7	76.1	2.2	2.8	28.4	2.6	8.4	52.3	16.8	24.3
Glu	161.7	6.0	3.6	25.2	3.4	11.8	79.1	6.7	7.8	74.7	4.0	5.1	26.5	4.1	13.3	54.2	21.0	27.9
Tyr	25.5	0.2	0.9	15.3	0.5	3.2	30.1	0.9	3.0	73.8	1.5	2.0	16.2	1.3	7.4	36.3	9.1	20.0
Orn	108.1	18.0	14.3	33.7	2.1	5.8	81.8	7.1	8.0	79.4	5.3	6.3	30.5	3.2	9.4	57.7	14.7	20.3
Lys	121.2	1.5	1.2	22.0	0.4	1.7	51.9	1.1	2.1	65.0	0.8	1.3	15.0	0.7	4.5	25.9	3.6	12.2
Σ	2000.1	55.7	2.7	861.0	45.6	5.0	1717.7	76.7	4.3	1865.6	57.6	3.0	1006.5	91.4	8.3	1423.3	361.3	20.2

<sup>a</sup> AAAs are listed according to their order of elution on resolution by gas chromatography (GC)

<sup>b</sup> Non-chiral AAAs

404

**Fig. 1a, b** Gas chromatography coupled with selected ion-monitoring mass spectrometry (GC/SIM-MS) of the balsamic vinegar, aceto balsamico di Modena (ABM) **a** matured for 5 years (sample 2); **b** matured for 25 years (sample 6). The *inserts* show the results of separate analyses for the detection of D- and L-Pro using a lower injection volume in order to prevent column overloading. For chromatographic conditions, see Materials and methods. For abbreviations of amino acids, see Table 1



bacterial activity, all samples contained significant relative amounts of D-Pro (0.3–5.2%). However, in comparison to balsamic vinegars, the absolute amounts did not exceed 3.8 mg l<sup>-1</sup>, determined in red wine vinegar 9, and 4.4 mg l<sup>-1</sup> in sherry vinegar 13. Traces of some other D-AAAs also occurred in several red wine vinegars and sherry vinegars. A chromatogram of red wine vinegar 10 is shown in Fig. 2.

#### White wine vinegars, spirit vinegars and blends

The two white wine vinegars examined (samples 14 and 15, Table 5) contained 135 mg l<sup>-1</sup> and 385 mg l<sup>-1</sup> of L-

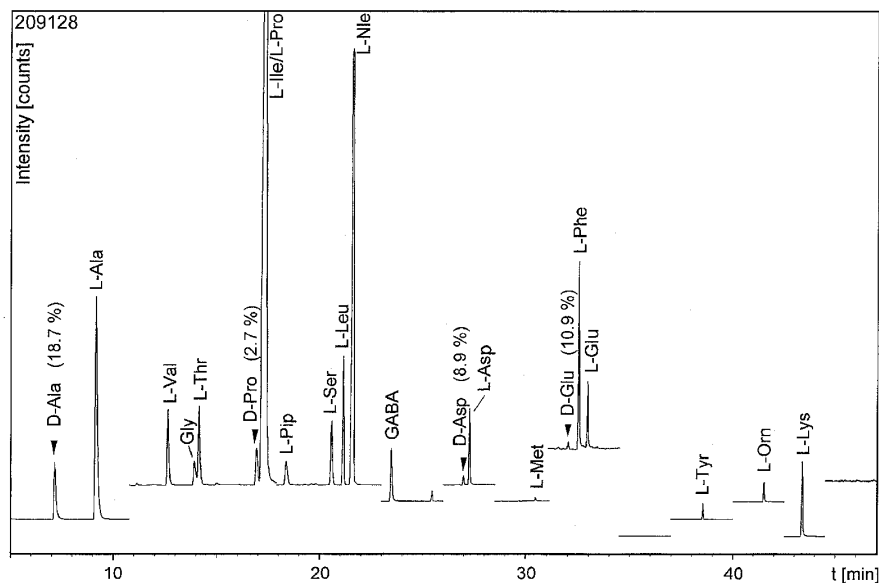
AAAs, respectively. Again, L-Pro was the major AA (95 mg l<sup>-1</sup> and 256 mg l<sup>-1</sup>, respectively), but in contrast to red wine and sherry vinegars no D-Pro was detected. The absolute amounts of D-Ala, D-Asp and D-Glu were very low. Only vinegar 15 contained traces of other D-AAAs. The sum of all D-AAAs accounted for only 0.5% of AAAs (relative) in both samples.

Spirit vinegars (samples 16 and 17, Table 5) contained unusually high amounts of L-Glu (847 mg l<sup>-1</sup> and 210 mg l<sup>-1</sup>, respectively), whereas only low amounts of other AAAs were detected. L-Glu was the major AA in both cases, and besides traces of D-Ala, D-Asp and D-Pro, only relatively high amounts of D-Glu were found. Data of vinegars 16 and 17 were similar to those for



406

**Fig. 2** GC/SIM-MS of red wine vinegar (sample 10). For abbreviations of amino acids, see Table 1



vinegars 18–20, labeled as spirit vinegars blended with 25–33.3% of wine vinegar. The latter contained L-AAs in the range 138–3007 mg l<sup>-1</sup>. Only D-Ala, D-Asp and D-Glu were found in these samples. L-Glu was the major AA in two out of three samples. Extraordinarily high amounts of L-Glu (2816 mg l<sup>-1</sup>) were detected in sample 20, labeled as containing monosodium glutamate as a flavour enhancer. Although the absolute amount of D-Glu (9.7 mg l<sup>-1</sup>) was high, the relative amount was only 0.3%. In comparison, the absolute D-Glu content of red and white wine vinegars and sherry vinegars ranged from 0.2 mg l<sup>-1</sup> to 3.1 mg l<sup>-1</sup>, i.e. 3.4–15.3% relative content.

Dry matter contents (3.9–4.8 g l<sup>-1</sup>) and densities (1.009–1.011 g ml<sup>-1</sup>) of spirit vinegars 16 and 17 and spirit vinegars blended with wine vinegars (samples 18–20) were very low, with the exception of sample 20 in which the dry matter amounted to 40.3 g l<sup>-1</sup> and the density was 1.034 g ml<sup>-1</sup>. This is attributed to the addition of sodium chloride as declared for this sample.

#### Cider vinegars and rice vinegars

Cider vinegars (samples 21 and 22, Table 6) contained low amounts of L-AAs (44 mg l<sup>-1</sup> and 34 mg l<sup>-1</sup>, respectively). L-Pro was the dominant AA (11 mg l<sup>-1</sup> and 8 mg l<sup>-1</sup>, respectively). Besides the D-AAs typical for bacterial fermentation, traces of some other D-AAs were detected. The total amounts of D-AAs in cider vinegars 21 and 22 were 1.7 mg l<sup>-1</sup> and 1.6 mg l<sup>-1</sup>, respectively. Although only low absolute amounts of D-Ala were detected (0.9 mg l<sup>-1</sup> and 0.7 mg l<sup>-1</sup>, respectively), their relative amounts accounted for 22.0% and 25.9% of total AAs, respectively. Dry matter and density of cider vi-

negars were similar to red wine vinegars and sherry vinegars (see Table 2).

The group of rice vinegars (samples 23–25, Table 6) was very diverse with respect to the AA content and pattern. The amounts of L-AAs ranged from as low as 36 mg l<sup>-1</sup> to as much as 6860 mg l<sup>-1</sup>. Sample 23 contained the highest amounts of free L-AAs of all vinegars analyzed. In this vinegar L-Ala was the major AA (1015 mg l<sup>-1</sup>) and the relative amount of D-Ala was 25.3%. In contrast to vinegars made from grapes and fruits, L-Pro was a minor component of all rice vinegars. Sample 23 contained the highest absolute amounts of D-AAs (531 mg l<sup>-1</sup>) of all the vinegars investigated. A chromatogram of sample 23 is shown in Fig. 3.

Rice vinegars 24 and 25 contained much lower amounts of L- and D-AAs in comparison to sample 23. In sample 24, L-Asp (63 mg l<sup>-1</sup>) was most abundant. The high relative amounts of D-AAs in sample 25, particularly that of D-Ala (57.7%), were remarkable. The dry matter (2.5 g l<sup>-1</sup>) and density (1.003 g ml<sup>-1</sup>) of sample 25 were the lowest of all the vinegars investigated.

#### Discussion

For balsamic vinegars the data presented in Table 3 show a positive correlation between the content of D-AAs and maturation time. The absolute amounts of D-Pro and D-Ala increased remarkably in the course of maturation. Particularly D-Pro can be used as a marker AA for maturation. These results are in agreement with those of Chiavaro et al., who recently investigated samples of traditional and commercial balsamic vinegar [4]. However, in their paper, only relative and no absolute amounts of D-AAs were given.

**Table 6** AAs in cider vinegars (nos. 21 and 22) and rice vinegars (nos. 23–25). For abbreviations, see Table 1

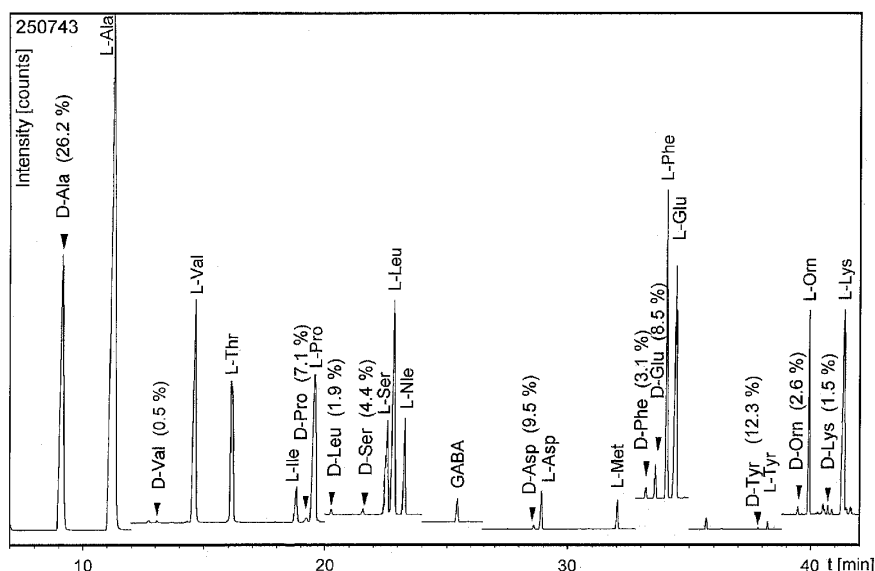
No.	21			22			23			24			25		
	Amount			Amount			Amount			Amount			Amount		
AA <sup>a</sup>	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)	L (mg/l)	D (mg/l)	D (%)
Ala	3.2	0.9	22.0	2.0	0.7	25.9	1015.4	343.2	25.3	28.6	6.2	17.8	2.2	3.0	57.7
Val	1.7	0	–	2.0	0	–	518.3	2.6	0.5	13.3	1.2	8.3	2.5	0	–
Thr	2.4	0	–	1.7	0	–	285.5	0	–	3.2	0	–	2.0	0	–
Gly	1.2	–	–	0.4	–	–	432.9	–	–	0.5	–	–	1.9	–	–
Ile	1.2	0	–	1.7	0	–	413.3	0	–	1.8	1.8	50.0	0.0	0	–
Pro	11.4	0	–	7.9	0	–	98.6	8.0	7.5	3.5	0	–	3.2	1.1	25.6
Pip	1.1	0	–	1.1	0	–	11.1	0	–	1.8	0	–	3.0	0	–
Leu	2.2	0	–	1.6	0	–	723.7	12.8	1.7	3.4	0	–	3.5	0	–
Ser	1.8	0	–	1.3	0	–	368.0	18.0	4.7	8.1	0.8	9.0	1.9	0.2	9.5
GABA	0.9	–	–	0.6	–	–	77.3	–	–	3.4	–	–	0.4	–	–
Asp	2.8	0.2	6.7	4.5	0.5	10.0	78.7	8.1	9.3	63.0	15.9	20.2	2.0	0.7	25.9
Met	0.4	0	–	0.5	0	–	89.1	0	–	0.0	0	–	0.4	0	–
Phe	1.4	0.1	6.7	1.3	0.1	7.1	231.9	7.7	3.2	1.6	0	–	2.7	0.1	3.6
Glu	6.4	0.4	5.9	4.2	0.3	6.7	956.0	91.8	8.8	8.1	0.6	6.9	3.2	1.3	28.9
Tyr	1.0	0	–	1.1	0	–	13.0	2.1	13.9	1.1	0	–	4.4	0	–
Orn	2.5	0	–	0.8	0	–	984.2	29.0	2.9	0.0	0	–	2.2	0	–
Lys	2.2	0.1	4.3	0.8	0	–	563.4	8.1	1.4	1.1	0	–	0.3	0	–
Σ	43.8	1.7	3.7	33.5	1.6	4.6	6860.4	531.4	7.2	142.5	26.5	15.7	35.8	6.4	15.2

<sup>a</sup> AAs are listed according to their order of elution on resolution by GC

When the level of D-AAs relative to the dry matter content of the balsamic vinegars was examined, with one exception, an increase was observed over time. Values ranged from 0.16 mg D-AAs per gram dry matter of sample 2 (5 years) to 0.94 mg D-AAs per gram dry matter of sample 6 (25 years). This is partly a result of the huge extent to which balsamic vinegars are concentrated during preparation and ageing, since small amounts of D-AAs are already present in fresh grape juices [20]. However, the amounts of D-AAs relative to

L-AAs also increased. The time-dependent increase in the levels of D-AAs amounts was explained by acid-catalyzed isomerization of L-AAs [4, 21]. However, in our experiments the heating of a mixture of 0.5 mM L-Pro and L-Asp in 5% acetic acid (pH 2.5) at 100°C for 48 h yielded 1.1% D-Pro and 35.2% D-Asp. Consequently, an entirely acid-catalyzed mechanism generating 35.3% D-Asp (see Table 3) should be accompanied by amounts of D-Pro not exceeding 1.1%. Much higher amounts of D-Pro (26.1%) were detected in balsamic

**Fig. 3** GC/SIM-MS of rice vinegar (sample 23). For abbreviations of amino acids, see Table 1



vinegar 6. Thus, a microbial enzymatic isomerization of L-AAs [22], particularly of L-Pro, most likely takes place in the course of maturation of balsamic vinegars. Bacteria and their isomerases [22] are still active in matured vinegars.

According to Italian legislation the addition of wine vinegar to ABM is allowed. Due to the relatively low D-Pro content of wine vinegar, the ratio of D/L-Pro in ABM should decrease on blending. Because of the concentration process associated with the preparation of vinegar, the absolute amount of L-Pro in particular should increase. As indicated by the detection of the highest absolute amounts of L-Pro relative to the other AAs among all vinegars investigated, it was most likely that wine vinegar had been added to sample 3 in the course of maturation. This was also indicated by the low relative content of D-Pro in this sample compared to other balsamic vinegars of comparable age.

Vinegars made from red wine showed little variation with respect to the content of AAs, despite the variety of grapes, raw materials and treatments used during production.

Vinegars made from sherry contained the highest absolute amounts of D-Ala, D-Asp and D-Glu of all the wine vinegars examined. This might be due to the use of grape must and a special production process of sherry known as the "solera" procedure [23]. Notably, sherry contains high relative amounts of D-AAAs, as fortified wines generally do [17].

Surprisingly, in the white wine vinegars examined no D-Pro was detected and the absolute amounts of D-AAAs were low ( $0.7 \text{ mg l}^{-1}$  and  $1.9 \text{ mg l}^{-1}$ ). In contrast, all red wine vinegars examined contained D-Pro and significantly higher amounts of D-AAAs. This might be due to grape varieties as well as to the different production processes, i.e. intensive fermentation takes place in the mash, but for white wine production the mash is filtered and separated from the grape must.

The high L-Glu content of most spirit and blended spirit/wine vinegars was remarkable. Notably, L-Glu accounted for about 94–98% of the total AA content of all spirit and spirit/wine vinegars, with the exception of sample 19. This indicated that sodium glutamate (E 621) was added to the former as a flavour enhancer. Although addition of glutamate has to be declared on the product label following national food laws this was only observed in the case of vinegar 20. It might be that the detected amounts of glutamate in the other samples originated from the extracts of herbs and spices added. However, in sample 9, a red wine vinegar with extracts of shallots, and in sample 15, a white wine vinegar containing extracts of tarragon, such high amounts of L-Glu were not detected.

Remarkably, one of the vinegars made of mixtures of spirits and wine (sample 18), labeled as containing 25% of wine vinegar, contained only  $4 \text{ mg l}^{-1}$  of L-Pro. Compared to both of the other vinegars obtained by blending spirit vinegar with wine vinegar (samples 19 and 20) this amount was very low. It was expected that

the L-Pro content of a spirit vinegar containing 25% of wine vinegar would be in the range of at least  $20\text{--}24 \text{ mg l}^{-1}$ . Thus, the result indicated that this spirit vinegar contained less than 10% wine vinegar, as an average L-Pro content of about  $100\text{--}150 \text{ mg l}^{-1}$  was determined for the wine vinegars investigated.

The diversity of the rice vinegars examined was already obvious by visual inspection. Sample 25 was an almost colorless, transparent solution, while samples 23 and 24 were dark brown and highly viscous liquids. The alcoholic fermented raw material of sample 25 had most likely been distilled before acetic fermentation was carried out, while for the production of samples 23 and 24 the filtered mash was subjected to acetic fermentation. The very low dry matter content of vinegar 25 also indicated the use of distilled raw materials for acetic fermentation. The differences between the AA composition of rice vinegars and European vinegars might be due to the use of special species of *Acetobacter* together with *Aspergillus mucor*, *Rhizopus zea* and *Absidia* sp. as additional starter cultures [24].

## Conclusions

The following results provided evidence that quantitative chiral AA analysis is a suitable method with which to control the quality and authenticity of vinegars:

1. The pattern and the enantiomeric distribution of AAs in vinegars was characteristic for the different raw materials (grape must, wine, cider, rice and spirits) used for the production of specific vinegars.
2. High amounts of L-Pro indicated the use of grape must for vinegar production.
3. In balsamic vinegars the absolute amounts of D-Pro and D-Ala increased in the course of maturation. Particularly D-Pro can be used as a marker AA for maturation.
4. D-Ala, D-Asp and D-Glu serving as chemical markers were present in all samples indicating that all vinegars had been produced by microbial fermentation (and not by dilution of synthetically produced acetic acid).
5. Chiral AA analysis can be used to distinguish between fermented and synthetic vinegar.

## References

1. Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ (eds) (1993) Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition, vol 7. Academic Press, London, pp 4773–4779
2. Bundesgesetzblatt (1972) I: Verordnung über den Verkehr mit Essig und Essigessenz vom 25. April 1972, p 732
3. Ebner H, Follmann H, Sellmer S (1995) Vinegar. In: Rehm H-J, Reed G (eds) Biotechnology, 2nd edn, vol 9. VCH Weinheim, pp 579–591
4. Chiavaro E, Caligiani A, Palla G (1997) Chiral indicators of ageing in balsamic vinegars. In: Amadò R, Battaglia R (eds) Proceedings of Euro Food Chem IX, vol 2, 24–26 September 1997, Interlaken, Switzerland, pp 421–426

5. Cichelli A, Procida G, Del Signore A (1997) Analysis of the volatile compounds of balsamic vinegar and ordinary wine vinegar by headspace GC-MS. In: Amadò R, Battaglia R (eds) Proceedings of Euro Food Chem IX, vol 2, 24–26 September 1997, Interlaken, Switzerland, pp 427–432
6. Plessi M, Monzani A, Coppini D (1988) *Agric Biol Chem* 52:25–30
7. Gálvez MG, Barroso CG, Pérez-Bustamante JA (1994) *Z Lebensm Unters Forsch* 199:29–31
8. García-Parilla MC, González GA, Heredia FJ, Troncoso AM (1997) *J Agric Food Chem* 45:3487–3492
9. Kahn JH, Nickol GB, Conner HA (1972) *J Agric Food Chem* 20:214–218
10. Schmid ER, Fogy I, Schwarz P (1978) *Z Lebensm Unters Forsch* 166:89–92
11. Bergner KG, Petri H (1959) *Angew Chem* 71:31
12. Bourgeois J (1957) *Branntweinwirtschaft* 79:250–254
13. Schanderl H, Staudenmayer T (1957) *Z Lebensm Unters Forsch* 104:26–28
14. Schleifer KH, Kandler O (1972) *Bacteriol Rev* 36:407–477
15. Brückner H, Becker D, Lüpke M (1993) *Chirality* 5:385–392
16. Brückner H, Hausch M (1989) *J High Res Chromatogr* 12:680–684
17. Brückner H, Langer M, Lüpke M, Westhauser T, Godel H (1995) *J Chromatogr* 697:229–245
18. Brückner H, Hausch M (1990) D-Amino acids as ubiquitous constituents in fermented foods. In: Lubec G, Rosenthal GA (eds) *Amino acids: chemistry, biology and medicine*. Escom, Leiden, pp 1172–1182
19. Erbe T, Brückner H (1997) Use of chiral amino acid analysis for quality and authenticity control of vinegar. In: Amadò R, Battaglia R (eds) Proceedings of Euro Food Chem IX, vol 1, 24–26 September 1997, Interlaken, Switzerland, pp 137–142
20. Brückner H, Westhauser T (1994) *Chromatographia* 39:419–426
21. Frank H, Woiwode W, Nicholson G, Bayer E (1981) *Liebigs Ann Chem*, pp 354–365
22. Adams E (1972) Amino acid racemases and epimerases. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, vol VI. Academic Press, New York, pp 479–507
23. Lafon-Lafourcade S (1983) Wine and brandy. In: Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, vol 5. VCH, Weinheim, p 81
24. Steinkraus KH (ed) (1983) *Handbook of indigenous fermented foods, microbiology series*, vol 9, section III: indigenous fermented foods in which ethanol is a major product. Dekker, New York, pp 301–432



## ORIGINAL PAPER

Thorsten Erbe · Hans Brückner

**Microwave treatment of dietary gelatin does not generate *cis*-4-hydroxy-L-proline, an inhibitor of collagen biosynthesis**

Received: 22 May 1998 / Revised version: 27 July 1998

**Abstract** Aqueous solutions (5 g/100 ml) of commercial preparations of (a) an enzymatic partial hydrolysate of gelatin and (b) type A gelatin were subjected to threefold heating to boiling in a domestic microwave oven at 750 W and to conventional heating. Then samples were totally hydrolyzed (6 M hydrochloric acid, 110 °C, 24 h) and investigated for the presence of eight possible stereoisomers of 3- and 4-hydroxyproline (Hyp) using capillary gas chromatography. Amino acids were analyzed as *N*(*O*)-trifluoroacetyl 2-propyl esters on Chirasil-L-Val and detected by selected ion monitoring mass spectrometry. Blanks of (a) and (b) were analyzed in parallel. Relative amounts of  $5.0 \pm 0.2\%$  *cis*-4-D-Hyp were generated from native *trans*-4-L-Hyp as a result of total hydrolysis in all samples and independent of previous treatment. Notably, neither *cis*-3-L-Hyp nor *cis*-4-L-Hyp could be detected in either of the gelatin samples. Thus a report on the generation of antifibrotic and therefore potentially hazardous *cis*-3-L-Hyp and *cis*-4-L-Hyp from protein-bonded native *trans*-3-L-Hyp and *trans*-4-L-Hyp on microwave heating of infant formulae could not be confirmed.

**Key words** Amino acid epimerization · Infant formulae · Food proteins · Hydroxyproline stereoisomers · Gas chromatography-mass spectrometry

Parts of the results were presented at the 56th Arbeitstagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, March 9–10, 1998, Giessen, Germany, and at the 35th Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, March 19–20, 1998, Kiel, Germany

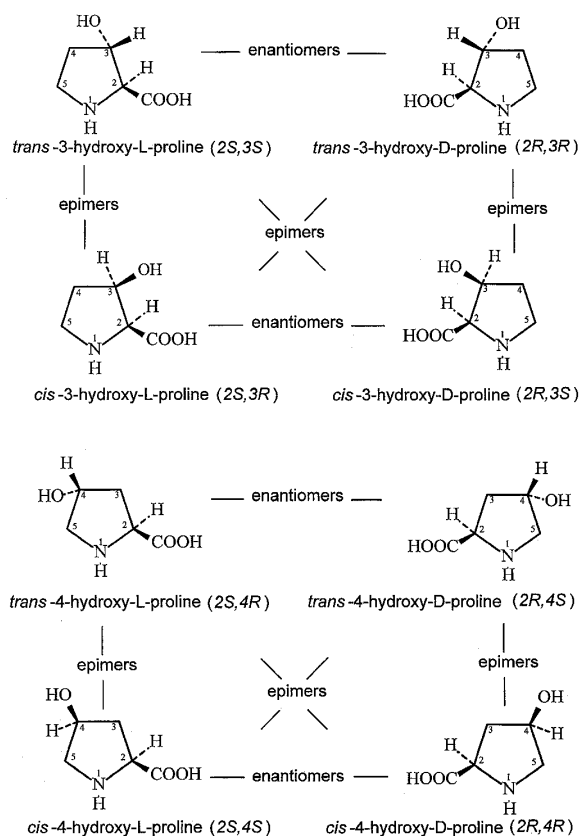
T. Erbe · H. Brückner (✉)  
Institute of Nutritional Science, Department of Food Sciences,  
Justus-Liebig-University of Giessen, Südanlage 6,  
D-35390 Giessen, Germany  
e-mail: hans.brueckner@ernahrung.uni-giessen.de

**Introduction**

Microwave cooking, heating, tempering, and thawing of food is nowadays well established in the majority of private households, snack bars, and restaurants, as well as in the food processing industry [1, 2]. Taking this into account, a letter of Lubec et al. [3] attracted much attention, claiming that microwave heating of infant milk formulae generates potentially toxic D-proline (D-Pro) from L-proline (L-Pro), as well as *cis*-3-L-Hyp and *cis*-4-L-Hyp from native protein *trans*-3-L-Hyp and *trans*-4-L-Hyp (for structures of hydroxyproline stereoisomers, see Fig. 1).

The antifibrotic potential of *cis*-4-L-Hyp is well documented, as well as the fact that this amino acid can be incorporated into procollagen during collagen biosynthesis [4–6]. Further, *cis*-3-L-Hyp has been reported to exhibit antigenic and degradative effects on collagenous tissues [7, 8]. Therefore, hazardous effects (structural, functional, and immunological changes) on consumption of microwave treated food were postulated [3, 9]. However, neither the formation of D-Pro on microwave treatment of milk and milk-based infant formulae [10, 11] nor the toxicity of D-Pro on experimental animals could be confirmed [12].

The claim that *cis*-3-L-Hyp and *cis*-4-L-Hyp are formed in three microwave treated infant formulae investigated by Lubec et al. did not attract much attention. This is attributed to the fact that milk proteins are rich in Pro but do not contain Hyp. Thus, no Hyp was detected in milk or infant formulae based on milk proteins exclusively [10, 11]. However, abundant *trans*-4-L-Hyp and approx. 5% *cis*-4-D-Hyp were detected in one commercial infant formula declared as consisting of a mixture of soy protein, free amino acids (AAs), and hydrolyzed animal protein. Consequently, that animal protein was assumed to be gelatin [10]. Indeed, enzymatic partial hydrolysates of gelatin are used for the preparation of easily water-soluble and non-gelling diet formulations [13].



**Fig. 1** Structures of the stereoisomers of 3- and 4-hydroxyproline and assignment of enantiomers and epimers

Gelatin is manufactured from collagenous raw materials such as bovine bones, pigskins, and cattle hides [13, 14]. Native collagen is synthesized as procollagen by ribosomal synthesis. Collagen's characteristic and abundant *trans-4-L-Hyp* is synthesized by enzymatic post-translational hydroxylation of specific proline residues [15]. Notably, in addition to *trans-4-L-Hyp*, low amounts of *trans-3-L-Hyp* (0.6–1.1%) were detected, for example in type IV collagen of basal membranes [16] and in type I collagen of renal cortex [17–19]. Therefore, increased urinary *trans-3-D/L-Hyp* ratios were suggested to be useful markers for a renal collagen disorder named Alport syndrome [20].

In the investigations carried out in order to verify the findings of Lubec et al., it was overlooked [10, 11] that the authors [3] actually did report that "...conventionally heated milk samples did not contain *cis-3* or *cis* hydroxyproline. However, all three formulae contained *cis* stereoisomers of hydroxyproline after microwave treatment...". From the context of that report [3] and the references cited therein [21–23] it is obvious that "*cis-3* or *cis-4* hydroxyproline" refer to *cis-3-L-Hyp* and *cis-4-L-Hyp*, and not to *cis-3-D-Hyp* and *cis-4-D-Hyp* as

assumed by Fay et al. and Marchelli et al. [10, 11]. Consequently, the question whether or not the *cis* isomers of 3- and 4-L-Hyp are generated from dietary gelatin by microwaves and/or are released on total hydrolysis from the natural *trans*-isomers was still open.

In order to clarify this question and in continuation of work on amino acid epimerization in the course of industrial gelatin manufacturing and processing [24], we decided to subject an enzymatic gelatin partial hydrolysate and pure gelatin to microwave treatment followed by acidic total hydrolysis. The possible isomerization of native hydroxyproline stereoisomers was investigated by chiral gas chromatography and highly sensitive and specific selected ion monitoring mass spectrometry.

## Materials and methods

**Chemicals, solvents and sample materials.** All chemicals and solvents were of analytical grade: dichloromethane (DCM), 2-propanol (2-PrpOH), acetyl chloride (AcCl), hydrochloric acid (HCl), 32% (all from Merck, Darmstadt, Germany), sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), 98% (Roth, Karlsruhe, Germany), trifluoroacetic acid anhydride (TFAA), 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT), and barium hydroxide octahydrate ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland). Stereoisomers of Hyp (*cis-3-DL-Hyp*, *cis-4-L-Hyp*, *cis-4-D-Hyp*) were purchased from Sigma (St. Louis, Mo., USA), and *trans-4-L-Hyp* from Fluka.

The stereoisomers not commercially available (*trans-3-DL-Hyp* and *trans-4-D-Hyp*) were synthesized according to the literature [25]: to *cis-3-DL-Hyp* (5 mg) 0.2 M aqueous  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (0.5 ml) was added and the mixture was heated at 110 °C for 24 h. Suitable amounts of 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  were added in order to neutralize  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . The barium sulfate precipitated was removed by centrifugation, the supernatant was dried in a nitrogen stream, and the residue, containing mainly *trans-3-DL-Hyp*, was used for derivatization.

A sample of *cis-4-L-Hyp* (5 mg) was heated in 8.77 M HCl in a sealed Reacti-vial (Wheaton, Millville, N.J., USA) at 130 °C for 72 h. Acid was removed in a stream of nitrogen and the remaining residue containing a mixture of *cis-4-L-Hyp* and *trans-4-D-Hyp* (ratio ca. 2:1) was used for derivatization.

Gelatin hydrolysate (Gelita-Sol, obtained by enzymatic partial hydrolysis, average molecular weight 3000 Da) was provided by the Deutsche Gelatine-Fabriken (DGF) Stoess, Eberbach, Germany. Gelatin (pure type A, made from pigskins) was from Ewald Werke, Sobernheim, Germany.

**Sample preparation and derivatization.** In separate experiments, Gelita-Sol (sample A) or gelatin (sample B) (5 g) in doubly distilled water (100 ml) were used for microwave treatment, for conventional heating and as control. A domestic microwave oven (Model HF 12520, Siemens AG, München; power output 750 W, according to IEC 705) was used. In experiment 1, samples were heated on a conventional electric hot-plate up to boiling temperature three times and were allowed to cool at room temperature in between. In experiment 2, samples were treated with 90 W power for 20 min (final temperature 50 °C) in order to test whether there was an intrinsic microwave effect besides the thermal effect. In experiment 3, samples were treated three times with 750 W power for 4 min up to boiling temperature. Samples were allowed to cool at room temperature in the interim periods. Samples were heated in open Erlenmeyer flasks in order to simulate common household conditions. Samples from experiment 4 were the untreated controls of gelatin partial hydrolysate and type A gelatin, respectively.

**Table 1** Relative amounts (%) of *cis*-4-hydroxy-D-proline in total hydrolysates of aqueous solutions (5%) of Gelita Sol (A) and gelatin (B) subjected to microwaves (90 W and 750 W) and heated conventionally on a hot-plate in comparison to untreated con-

trols. Two sample preparations, named A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, and B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, respectively, were analyzed in two parallel experiments (*n* = 4 injections); SD = standard deviation; (for sample treatment, see Materials and methods)

<i>n</i>	Experiment 1 (hot-plate) <sup>a</sup>		Experiment 2 (micro- wave 90 W) <sup>a</sup>		Experiment 3 (microwave 750 W)				Experiment 4 (control)			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
1	5.1	4.8	5.1	4.8	5.1	4.8	4.9	4.8	4.5	5.1	4.9	4.8
2	5.3	5.5	5.0	5.2	5.3	4.5	5.1	5.5	5.0	5.0	5.2	5.1
3	4.9	4.9	4.4	4.7	4.9	4.7	4.9	4.9	4.6	4.7	5.2	5.3
4	4.9	4.9	4.9	5.2	4.8	5.3	4.9	5.3	5.1	4.8	4.9	5.1
Average	<b>5.05</b>	<b>5.03</b>	<b>4.85</b>	<b>4.98</b>	<b>5.03</b>	<b>4.83</b>	<b>4.95</b>	<b>5.13</b>	<b>4.80</b>	<b>4.90</b>	<b>5.05</b>	<b>5.08</b>
SD	0.17	0.28	0.27	0.23	0.19	0.29	0.09	0.29	0.25	0.16	0.15	0.81

<sup>a</sup> B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> not carried out (see Discussion)

For hydrolysis aliquots (1 ml) of samples of experiments 1–3 and of the controls (experiment 4) were transferred into 5 ml Reacti-vials (Wheaton). Then HCl (8.77 M, 2.17 ml) was added for carrying out total hydrolysis under standard conditions (6 M HCl at 110 °C for 24 h).

Besides the gelatin samples, a sample of enantiomeric pure *trans*-4-L-Hyp was treated under extremely acidic, heated conditions (10 mg of *trans*-4-L-Hyp in 1 ml 8.77 M HCl at 130 °C for 48 h) to test whether trace amounts of the *cis*-4-L-isomer were formed.

For conversion of AAs into *N*(*O*)-trifluoroacetyl 2-propyl esters, aliquots (200 µl) of the hydrolysates were used. HCl was removed in a stream of nitrogen, the antioxidant BHT (10 µl of a solution of 10 mg ml<sup>-1</sup> in 2-PrpOH) and a mixture of 2-PrpOH/AcCl (4:1) (500 µl) were added. The tightly closed vials were heated at 100 °C for 1 h. Solvents were removed with N<sub>2</sub>, DCM (200 µl) and TFAA (50 µl) were added, and the mixture was heated at 100 °C for 20 min. Solvents were removed in a stream of nitrogen. The residue was dissolved in DCM (200 µl) and portions of 0.6–1.0 µl were subjected to GC/MS at a split ratio of 1:50. MS was run in selected ion monitoring (SIM) mode.

Relative amounts (%) of *cis*- and *trans*-D-isomers were calculated according to Eq. 1 and 2:

$$cis\text{-D} (\%) = A_{cis\text{-D-isomer}} \times 100 / (A_{cis\text{-D-isomer}} + A_{trans\text{-L-isomer}}) \quad (1)$$

$$trans\text{-D} (\%) = A_{trans\text{-D-isomer}} \times 100 / (A_{trans\text{-D-isomer}} + A_{cis\text{-L-isomer}}) \quad (2)$$

where *A* is the peak area of the respective *cis*- or *trans*-D- or L-isomer.

For repeatability tests, each sample was subjected to GC/MS four times. The results shown are the average of two parallel preparation/derivatization procedures (see Table 1).

**Capillary gas chromatography.** A Shimadzu GC-17A gas chromatograph and a Shimadzu QP-5000 mass spectrometer were used. The column was a fused silica Chirasil-L-Val capillary column [26, 27] (25 m × 0.25 mm ID, Chrompack, Middelburg, The Netherlands). The carrier gas was helium at an inlet pressure of 80 kPa (flow rate 0.5 ml min<sup>-1</sup>). The temperatures of injector and interface were 250 °C; samples were injected in split mode (split ratio 1:50). Temperature program: initial temp. 75 °C held for 8.5 min; heating rate A: 2.5 °C min<sup>-1</sup> to 100 °C; rate B: 3.5 °C min<sup>-1</sup> to 145 °C; rate C: 10.0 °C min<sup>-1</sup> to 190 °C held for 4 min. Pressure program: initial pressure 5.0 kPa held for 8.5 min, increased at 0.2 kPa min<sup>-1</sup> up to 7.0 kPa, increased at 0.3 kPa min<sup>-1</sup> to 10.9 kPa, increased at 1.0 kPa min<sup>-1</sup> to 15.0 kPa, held for 4.5 min.

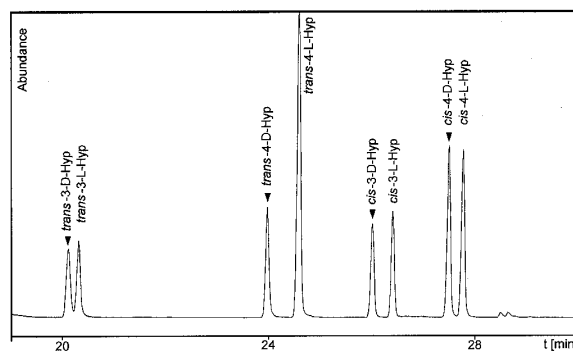
GC/MS control and data processing were performed by a Shimadzu class 5000 workstation and class 5000 software.

## Results

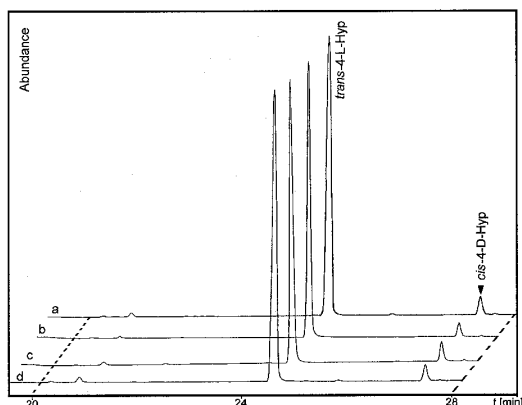
The complete separation of all stereoisomers of 3- and 4-hydroxyproline in a GC run is shown in Fig. 2.

No differences referring to the ratios of Hyp isomers were detected in total hydrolysates of aqueous solutions of either untreated (blank), microwave heated or conventionally heated Gelita-Sol (sample A) and gelatin (sample B). All hydrolysates contained *trans*-4-L-Hyp as the major component. Notably, no *cis*-4-L-Hyp was detected in total hydrolysates of either Gelita Sol (Fig. 3) or gelatin.

The average amount of *cis*-4-D-Hyp was about 5% relative to the sum of *trans*-4-L-Hyp and *cis*-4-D-Hyp in all cases (see Table 1). Relative to that sum, only traces of *trans*-3-L-Hyp (0.2–0.25%) were detected in acidic total hydrolysates of pure gelatin (sample B) (in untreated controls as well as in microwave treated samples), but not in the acidic total hydrolysates of sample A.



**Fig. 2** GC/SIM-MS of a standard of all eight 3- and 4-hydroxyproline stereoisomers, separated on Chirasil-L-Val as *N*(*O*)-trifluoroacetyl-Hyp-2-propyl esters



**Fig. 3** GC/SIM-MS of total hydrolysates of aqueous solutions (5%) of Gelita-Sol focusing on Hyp stereoisomers, separated on Chirasil-L-Val as *N*(*O*)-trifluoroacetyl-Hyp-2-propyl esters: *a* conventionally heated on hot-plate, *b* microwave treated (90 W), *c* microwave treated (750 W), *d* untreated control (for details see Materials and methods)

Further, in a standard of *trans*-4-L-Hyp that for comparison had been treated under extreme conditions with 8.8 M HCl for 48 h at 130 °C, increased amounts of about 8% of *cis*-4-D-Hyp were found, but again no *cis*-4-L-Hyp was detected (detection limit ca. 0.1% of the peak area of *trans*-4-L-Hyp). These results, showing the partial epimerization of *trans*-4-L-Hyp providing *cis*-4-D-Hyp, corroborate data reported previously [10, 11, 24, 28].

## Discussion

It was demonstrated that epimerization of *trans*-4-L-Hyp in dietary gelatin leads to the formation of *cis*-4-D-Hyp, and not to *cis*-4-L-Hyp. The formation of *cis*-4-L-Hyp via epimerization reactions would only be possible if significant amounts of *trans*-4-D-Hyp were present in the protein. However, that was not the case in the gelatin samples investigated and is very unlikely for other ribosomally synthesized food proteins. As far as we know, protein-bonded *cis*-4-L-Hyp has not yet been detected in food proteins.

The amounts of *cis*-4-D-Hyp formed in microwave treated, conventionally heated and in untreated control samples showed no significant differences ( $P < 0.01$ ). Therefore, the gelatin sample (sample B) was exposed only to high microwave power (750 W) (see Table 1).

From the data it is concluded that the formation of about 5% of *cis*-4-D-Hyp from *trans*-4-L-Hyp is exclusively the result of acidic total hydrolysis that had to be carried out in order to release free AAs from gelatin. It might be that under the conditions described in the literature [3] the amounts of *cis*-4-D-Hyp formed in the course of the acid hydrolysis of the infant formulae were misinterpreted to be *cis*-4-L-Hyp. This is sup-

ported by the fact that the achiral TLC [22] and HPLC [23] methods reported to have been used for the detection and separation of *cis*-3-Hyp from *cis*-4-Hyp [3] are not suitable for the separation of the enantiomers *cis*-3-D-Hyp and *cis*-3-L-Hyp or the enantiomers *cis*-4-D-Hyp and *cis*-4-L-Hyp, respectively.

With regard to the reported formation of *cis*-3-L-Hyp, it should be pointed out that certain types of collagens and gelatin contain minor amounts of *trans*-3-L-Hyp (approx. 0.8% in type IV collagen). Acidic total hydrolysis under standard conditions, by analogy to *trans*-4-L-Hyp, should generate ca. 5% *cis*-3-D-Hyp from *trans*-3-L-Hyp, that is, about 0.01% with respect to *trans*-4-L-Hyp. This is beyond the detectability even under the highly sensitive instrumental conditions described here (detection limit ca. 0.1% of total Hyp). Further, analogous to the epimerization of *trans*-4-L-Hyp, no formation of *cis*-3-L-Hyp is to be expected on microwave treatment or heating of protein-bonded (or free) *trans*-3-L-Hyp. The presence of 5% of *cis*-4-D-Hyp in the total hydrolysates of all samples was shown to be an artifact due to acidic catalyzed epimerization of *trans*-4-L-Hyp. This removes all doubts of possible pathological effects of microwave treated foodstuffs containing collagen or its derivatives, referring to AA isomerization. Studies dealing with the incorporation of *cis*-Hyp into collagen only refer to the L-isomer [4, 6, 7, 29] and not to *cis*-D-Hyp.

In conclusion, a report on the isomerization of native, food protein-bonded hydroxyproline claiming the formation of potentially harmful, antifibrotic *cis*-4-L-Hyp (or *cis*-3-L-Hyp) on microwave treatment could not be confirmed. Since formation of D-Pro on microwave treatment of food and toxic effects of D-Pro on rats have also been disproved [10, 11, 12, 24, 30], there is no experimental evidence for the apprehensions concerning the microwave exposure of food proteins using common cooking practice. With regard to D-AAs in general, it should be stressed that they are common constituents in particular of fermented foods and beverages [31].

## References

- Decareau RV (1985) Microwaves in the food processing industry. Academic Press, New York
- Decareau RV (1992) Microwave science and technology. In: Hui YH (ed) Encyclopedia of food science and technology, vol 3. Wiley, New York, pp 1772-1778
- Lubec G, Wolf C, Bartosch B (1989) Lancet 334:1392-1393
- Uitto J, Prockop, DJ (1977) Arch Biochem Biophys 181:293-299
- Tan EML, Lasse Ryhänen MS, Uitto J (1983) J Invest Dermatol 80:261-267
- Barile FA, Guzowski DE, Ripley-Rouzier C, Siddiqi ZA, Bienkowski RS (1989) Arch Biochem Biophys 270:294-301
- Lubec G, Böck P, Häussler J, Herkner K, Lubec D, Mallinger R (1988) Antigenic changes of the glomerular basement membrane after the incorporation of 3-*cis*-hydroxyproline. In: Gubler MC, Sternberg M (eds) Progress in basement membrane research. Libbey, London, pp 357-361

8. Lubec B, Vycudilik W, Mallinger R, Häusler J, Popow C, Lubec G (1992) *Renal Physiol Biochem* 15:33-40
9. Lubec G (1990) *Lancet* 335:792
10. Fay L, Richli U, Liardon R (1991) *J Agric Food Chem* 39:1857-1859
11. Marchelli R, Dossena A, Palla G, Audhuy-Peaudecerf M, Le-feuvre S, Carnevali P, Freddi M (1992) *J Sci Food Agric* 59:217-226
12. Schieber A, Brückner H, Rupp-Classen M, Nowitzki-Grimm S, Specht W, Classen H-G (1997) *J Chromatogr B* 691:1-12
13. Keenan TR (1994) Gelatin. In: Kirk I, Othmer DF (eds) *Encyclopedia of chemical technology*, vol 12. Wiley, New York, pp 406-416
14. Alleavitch J, Turner WA, Finch CA (1989) Gelatin. In: Elvers B, Hawkins S, Ravenscroft M, Rounsaville JF, Schulz G (eds) *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, 5th edn, vol A12. VCH, Weinheim, pp 307-317
15. Ward AG, Courts A (eds) (1977) *The science and technology of gelatin*. Academic Press, New York
16. Dixit SN (1980) *Eur J Biochem* 106:563-570
17. Fujiwara S, Nagai Y (1981) *J Biochem (Tokyo)* 89:1397-1401
18. Risteli J, Bächinger HP, Engel J, Furthmayr H, Timpl R (1980) *Eur J Biochem* 108:239-250
19. Bellon GH, Chanard J, Borel JP (1988) Human kidney type I collagen contains a higher amount of 3-hydroxyproline than skin collagen. In: Gubler MC, Sternberg M (eds) *Progress in basement membrane research*. Libbey, London, pp 153-158
20. Lubec B, Arbeiter K (1993) *J Pediatr* 123:748-751
21. Lubec G (1988) Proline analogues influence collagen metabolism. In: Gubler MC, Sternberg M (eds) *Progress in basement membrane research*, Libbey, London, pp 353-356
22. Szymanowicz A, Poulin G, Randoux A, Borel JP (1979) *Clin Chim Acta* 91:141-148
23. Lindblad UJ, Diegelman RF (1984) *Anal Biochem* 138:390-395
24. Lüpke M, Brückner H (1998) *Z Lebensm Unters Forsch* 206:323-328
25. Greenstein JP, Winitz M (1961) *Chemistry of the amino acids*, vol 3. Wiley, New York, p 2040
26. Frank H, Nicholson GJ, Bayer E (1977) *J Chromatogr Sci* 15:174-176
27. König WA (1987) *The practice of enantiomer separation by capillary gas chromatography*. Hüthig, Heidelberg
28. Dziejatkowski DD, Hascall VC, Riolo RL (1972) *Anal Biochem* 49:550-558
29. Ripley CR, Bienkowski RS (1997) *Exp Cell Res* 236:147-154
30. Sieber R, Eberhard P, Gallmann PU (1996) *Int Dairy J* 6:231-246
31. Erbe T, Brückner H (1998) *Z Lebensm Unters Forsch A* 207:400-409

European Food Research and Technology (accepted for publication)

Thorsten Erbe ▪ Hans Brückner

## **Studies on the optical isomerization of dietary amino acids in vinegar and aqueous acetic acid**

Received: 13 September 1999

### **Abstract**

Time-dependent isomerization (racemization) kinetics of free amino acids (AAs) were studied in matured wine vinegar and aqueous acetic acid (AcOH) of pH 2.5 at 100 °C. Enantioselective analyses were performed by chiral gas chromatography – selected ion monitoring mass spectrometry. Data were compared to the isomerization of free L-AAs in 6 M HCl at 100 °C. The rate of isomerization on heating in vinegar and aqueous AcOH was Asp>Ser>>Pro, whereas in 6 M HCl it was Asp>Pro>>Ser. Heating of L-Pro together with glucose and fructose in 5% AcOH at 100 °C for 96 h lead to the formation of 24% D-Pro relative to L-Pro. From the data it is concluded that high relative amounts of D-Pro detected in matured vinegars are not attributable to acid-catalyzed racemization. Particularly in balsamic vinegars high relative amounts of D-Pro are mainly attributed to the Maillard reaction.

**Key words** D-Amino acids ▪ Racemization kinetics ▪ Keto-enol-tautomerism ▪ Maillard-reaction ▪ Balsamic vinegar

T. Erbe ▪ H. Brückner (✉)

Institute of Nutritional Science

Department of Food Sciences

Südanlage 6, D-35390 Giessen, Germany

e-mail: hans.brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de

## Introduction

In the course of chiral amino acid analysis of various vinegars, L-amino acids (L-AAs) as well as their mirror images (optical isomers or enantiomers), referred to as D-amino acids (D-AAs), could be detected [1]. It was realized that the amounts of D-AAs were dependent on raw materials used for the manufacturing processes and on fermentation conditions. Amounts of certain D-AAs increased with maturation. In particular, balsamic vinegars from Modena, Italy, showed an increase of D-proline (D-Pro) during ageing. Free L-Pro is the major AA in vinegars made from grape must or wine, respectively. It was assumed, therefore, that D-Pro might be used as indicator for the ageing process and thus for quality and authenticity control of these vinegars [1, 2].

The phenomenon of the presence of high relative amounts of D-Pro in balsamic vinegars was explained by the time-dependent acid-catalyzed optical isomerization of L-Pro [2]. This isomerization process is frequently referred to as racemization in the literature [3-7], although in the strict sense racemized AAs consist of exactly equal amounts of the D- and the L-enantiomers. Based on preliminary experiments, in a previous report we had pointed out, however, that among AAs, L-Asp is by far most prone to acid-catalyzed racemization at pH 2.5, and not L-Pro [1]. Consequently, an entirely acid-catalyzed isomerization of L-AAs in matured vinegars, in principle, should furnish amounts of D-Asp exceeding considerably those of D-Pro. In order to give a feasible explanation for the phenomena observed, here we report on studies on racemization kinetics of AAs on heating wine vinegar in comparison to a standard of L-AAs heated in aqueous acetic acid (AcOH) and 6 M hydrochloric acid (HCl). Additionally, effects of food components such as monosaccharides and metal ions on AA racemization were investigated.

## Materials and methods

### *Instrumental*

A Shimadzu GC-17A gas chromatograph (GC) coupled with a Shimadzu QP-5000 mass spectrometer (MS) (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used. An electron acceleration energy of 70 eV was selected for ionization. The MS was run in the selected ion monitoring (SIM) mode. GC/MS control and data processing were performed by a Shimadzu class 5000 workstation and software.

The column used for the separation of AA enantiomers was a fused silica Chirasil-L-Val [8] capillary column (25 m x 0.25 mm ID; Chrompack, Middelburg, The Netherlands). Carrier gas was helium (Messer Griesheim, Krefeld, Germany) at an inlet pressure of 80 kPa (flow rate 0.7 ml min<sup>-1</sup>). The temperatures of injector and interface were 250°C; samples were injected in split mode (split ratio 1:30). Temperature program: initial temp. 70°C held for 8.5 min; heating rate A: 2.5 °C min<sup>-1</sup> to 100 °C; rate B: 3.5 °C min<sup>-1</sup> to 145 °C; rate C: 6.5 °C min<sup>-1</sup> to 190 °C held for 9 min. Pressure program: initial pressure 5.0 kPa held for 8.5 min, increased at 0.2 kPa min<sup>-1</sup> up to 7.2 kPa, increased at 0.3 kPa min<sup>-1</sup> to 11.5 kPa, increased at 0.7 kPa min<sup>-1</sup> to 15.0 kPa, held for 9.7 min.

### *Chemicals, solvents and sample materials*

Dichloromethane (DCM), 2-propanol (2-PrpOH), acetyl chloride (AcCl), 32% aqueous hydrochloric acid (HCl) (all from Merck, Darmstadt, Germany), 25% aqueous ammonia (NH<sub>3</sub>), 100% acetic acid (AcOH) (all from Roth, Karlsruhe, Germany), pentafluoropropionic anhydride (PFPA), 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT), β-D(+)-glucose, β-D(-)-fructose, copper (II) sulfate pentahydrate (CuSO<sub>4</sub> • 5 H<sub>2</sub>O), acetoin (2-hydroxybutan-3-one), cation exchanger Dowex<sup>®</sup> 50 W X8, 200 - 400 mesh, corresponding to a particle size of 0.037 - 0.075 mm, H<sup>+</sup>-form (all from Fluka, Buchs, Switzerland). All solvents and chemicals were of reagent or analytical grade, except of acetoin which was of practical grade.

For experiments an AA standard H (1 ml sealed ampoules from Pierce, Rockford, Ill., USA) was used, consisting of Gly and the L-enantiomers of alanine (Ala), valine (Val), threonine (Thr), isoleucine (Ile), Pro, serine (Ser), leucine (Leu), Asp, methionine (Met), glutamic acid (Glu), phenylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) lysine (Lys), arginine (Arg), histidine (His) (2.5 mM each) and L-cystine (1.25 mM). Note Arg, His and cysteine (Cys) as well as tryptophan (if present in samples) could not be analyzed as a result of the methodology used. Rates of epimerization of Ile and Thr could not be determined satisfactorily because of the coelution of L-Thr and D-*allo*-Ile from the column. The enantiomeric purity of the L-AA standard used for racemization studies was >99.9% (cf. Table 3, t = 0 h).

A solution simulating vinegar of pH 2.5 was obtained by dilution of 100% AcOH with doubly distilled water to a concentration of 5% AcOH (v/v).

### *Sample treatment*

In experiments 1-5 described below, heating was carried out in 1 ml "Reacti-Vials" (Wheaton, Millville, N.J., USA) under nitrogen (N<sub>2</sub>) in a heating module ("Thermoblock", Gebr. Liebig, D-33626 Bielefeld, Germany) at 100 ± 1 °C for specified periods of time. Evaporation to dryness in experiments 2-5 was carried out at 70-80 °C in a stream of N<sub>2</sub> using the Thermoblock combined with an evaporating unit (Pierce, Model 18780, "Reacti-Vap").

Experiment 1: an aliquot of a commercial red wine vinegar (pH 2.8) was adjusted to pH 2.5 by addition of 1 M HCl. Aliquots (1 ml) were transferred into Reacti-Vials and were heated as described above. Then samples of the vinegar were passed through columns packed with Dowex<sup>®</sup> 50W X8 cation exchanger (bed volume: 4 cm length x 0.5 cm diameter). After washing with doubly distilled water, the AAs adsorbed were eluted with 4 M aqueous NH<sub>3</sub>. The eluates were evaporated to dryness in vacuo (bath temperature ca. 40 °C) using a rotary evaporator.

Experiment 2: the AA standard H (1 ml) was evaporated to dryness. AcOH (5 ml, 5 % v/v, pH 2.5) was added and aliquots (1 ml, final AA concentration 0.5 mM) were heated.

Experiment 3: aliquots (1 ml) of 0.5 mM L-Asp in 3.2 mM HCl (pH 2.5) were transferred into Reacti-Vials and heated as described. In parallel, aliquots (1 ml) of 0.5 mM L-Asp in 5% acetic acid (v/v) were heated.



Experiment 4: AA standard H (1 ml) was evaporated to dryness at 70-80 °C as described. Then 6 M HCl (5 ml) was added and aliquots (1 ml) were heated as described above.

Experiment 5: L-Pro (17 mM) in 5% AcOH was heated for 24-96 h at 100 °C together with additives: (a) equal amounts of fructose and glucose (0.28 M each); (b) CuSO<sub>4</sub> • 5 H<sub>2</sub>O (8.5 mM) + (a); (c) acetoin + (a) + (b); and (d) with no additives (control).

#### *Derivatization, analysis and quantification of relative amounts of amino acids*

Residues obtained from cation exchange treatment in experiment 1 were dissolved in 0.1 M HCl (500 µl) and transferred into 1 ml Reacti-Vials. Samples were evaporated to dryness in a stream of N<sub>2</sub> at 70-80 °C as described above.

For derivatization a mixture of 2-PrpOH/AcCl (4:1, v/v; 500 µl, corresponding to 2.5 M HCl in 2-PrpOH) and the antioxidant BHT (10 µl of a solution of 10 mg ml<sup>-1</sup> in 2-PrpOH) were added. The tightly closed vials were heated at 100 °C for 1 h. Solvents were removed in a stream of N<sub>2</sub> at room temperature, DCM (200 µl) and PFPA (50 µl) were added and the mixture was heated at 100 °C for 20 min. Reagents were removed in a stream of N<sub>2</sub> at room temperature, the remaining residues were dissolved in DCM (200 µl) and portions of 0.6-1.0 µl were analyzed by GC/MS.

Reacti-Vials with samples from experiments 2-5 were placed in a Thermoblock and solvents were removed in a stream of N<sub>2</sub> at 70-80 °C. Conversion into *N*(*O*)-penta-fluoropropionyl AA 2-propyl esters was carried out as described for experiment 1.

Relative amounts of D-AAs were calculated according to equation 1:

$$\% D = 100 \times A_D / (A_D + A_L) \quad (1)$$

where % D is the relative amount of the D-enantiomer, and A<sub>D</sub> and A<sub>L</sub> are the peak areas of the D- or L-enantiomer, respectively. Analytical data presented are the average of two parallel experiments.

First order kinetics were calculated according to equation 2 [9]:

$$\ln\left(\frac{1+D/L}{1-D/L}\right)_t - \ln\left(\frac{1+D/L}{1-D/L}\right)_{t=0} = 2 k t \quad (2)$$

where *k* is the first-order rate constant for interconversion of the AA enantiomers, D/L is the AA enantiomeric ratio at the time *t*. The *t* = 0 term was needed for the correction of the initial D-AA content in the red wine vinegar (cf. Table 1). For the enantiomerically pure L-AAs of the standard no correction was necessary (cf. Table 3, *t* = 0 h).

First-order rate constants of racemization of individual AAs were obtained from the slopes of the linear regression curves of the logarithmic plots of the respective AA according to equation 2.

## Results and discussion

### Heating experiments

Racemization of free L-AAs is known to be dependent on temperature together with time of exposure as well as structure of the AAs, pH, ionic strength of solvent, catalysts, and composition of the matrix in which the AAs occur [10].

In order to simulate ageing and maturation processes of AAs in vinegars heating experiments 1-4 were carried out. According to the Arrhenius equation an increase of the temperature of 10 °C accelerates first order chemical reactions two- to threefold [11]. Hence, as carried out in experiment 1, heating wine vinegar at 100 °C allows simulating an ageing process of several years within days. For example, heating of the vinegar for 96 h at 100 °C is about equal to 16.8 years of storage at 20 °C, assuming a 2.5-fold acceleration of the reaction rate.

Amounts of D-AAs in red wine vinegar and their increase on heating in experiment 1 are shown in Table 1. Since this vinegar was a fermented product declared to have been matured for 7 years, it already contained certain D-AAs. Amounts of 8.4% D-Asp initially present in this vinegar increased to 17.1% (47.2%) D-Asp after heating at 100 °C for 8 h (96 h). At the same time amounts of 1.9% D-Ser increased to 5.6% (20.0%), and 1.6% D-Pro increased to 1.8% (12.6%), respectively.

**Table 1** Time dependence of the acid-catalyzed isomerization of free amino acids in a red wine vinegar (adjusted to pH 2.5) at 100 °C; %D = 100 • D/(D+L); data are average of duplicate analyses

Time (h)	0	8	16	24	48	72	96
	(%D)						
D-Ala	7.27	9.89	10.67	12.61	14.42	16.61	18.14
D-Val	< 0.1	< 0.1	< 0.1	1.43	1.63	1.85	2.21
D-Pro	1.55	1.77	3.38	4.84	6.99	10.06	12.59
D-Ser	1.94	5.57	7.83	10.62	13.74	17.32	20.02
D-Leu	< 0.1	< 0.1	< 0.1	1.89	2.68	4.51	5.03
D-Asp	8.36	17.05	24.82	33.34	38.68	46.74	47.15
D-Met	< 0.1	< 0.1	< 0.1	5.01	6.18	7.36	10.64
D-Phe	0.99	1.92	4.03	5.23	7.86	11.04	13.98
D-Glu	4.28	7.40	8.39	8.71	9.15	10.46	11.64
D-Tyr	< 0.1	2.11	3.61	4.40	5.64	7.23	8.77
D-Lys	1.86	2.19	2.99	3.51	4.78	7.79	9.10

Kinetics of the time dependence of racemization of selected AAs in this red wine vinegar were obtained by plotting  $\ln(1+D/L)/(1-D/L)$  against time, where D and L are the peak areas of the respective D- and L-enantiomer of an AA (Fig. 1a). First-order rate constants of racemization of AAs are presented in Table 2 and compared to values of the literature [3, 5].

The plot  $\ln(1+D/L)/(1-D/L)$  against time of selected AAs (values corrected for initial D-AA content in the vinegar according to equation 2) shows that L-Asp is fastest racemizing ( $k_{\text{Asp}} = 40.4 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ), followed by Ser ( $k_{\text{Ser}} = 8.9 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ) and Pro ( $k_{\text{Pro}} = 2.9 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ). In other words, Asp racemized approx. 4 times faster than Ser and 13 times faster than Pro in vinegar of pH 2.5. The corrected data

demonstrate clearly that Pro is among the least racemizing AAs in vinegar taking an exclusively acid-catalyzed mechanism into account.

**Table 2** Rate constants ( $k$ ) of racemization of amino acids (AAs) in (a) red wine vinegar in comparison to an AA standard in 5% acetic acid (AcOH) at 100 °C and (b) our data of an AA standard in 6 M HCl at 100 °C in comparison to data obtained at 110 °C in 6 M HCl [3] and 6 M deuterium chloride (DCI) [5]

(a)

	red wine vinegar 100 °C, pH 2.5	5% AcOH 100 °C, pH 2.5
AA	$k \cdot 10^{-7} [\text{s}^{-1}]$	
Asp	40.28	32.64
Ser	8.89	7.94
Ala	5.14	1.81
Phe	4.44	1.58
Lys	3.47	1.53
Met	3.47	1.39
Tyr	3.06	1.11
Glu	2.92	0.83
Pro	2.78	0.69
Leu	1.67	0.42
Val	0.69	0.01

(b)

	6 M HCl 100 °C	6 M HCl 110 °C [3]	6 M DCI 110 °C [5]
AA	$k \cdot 10^{-8} [\text{s}^{-1}]$		
Asp	24.39	47.2	58
Pro	9.58	30.1	30
Glu	9.17	23.2	17.6
Met	7.39	18.9	17.6
Phe	7.29	16.7	11.8
Ala	5.85	15.5	13.2
Lys	5.81	16.2	13.4
Ser	5.71	1.4	<1
Leu	5.35	17.6	15.4
Tyr	4.58	13.0	10.8
Val	0.28	3.9	2.8

In experiment 2, a mixture of standard L-AAs was heated for periods of 24 to 360 h in 5% AcOH in order to elucidate possible food matrix effects on racemization of AAs. Results are shown in Table 3.

After 216 h (360 h) at 100 °C amounts of 49.6% (49.6%, unchanged) D-Asp were determined accompanied by 31.5% (42.7%) D-Ser and 5.3% (8.6%) D-Pro. This demonstrates that, similarly to experiment 1, Asp after 216 h of heat exposure was almost completely racemized. Racemization decreased in the order Asp>Ser>Ala>Phe>Lys>Met>Tyr>Glu>Pro>Leu>Val. Fast racemization of Asp at pH 2-3 was recognized previously [4]. Racemization kinetics of selected standard L-AAs heated in 5% AcOH are presented in Fig. 1b and rate constants of racemization are shown in Table 2.

## 6 Anhang

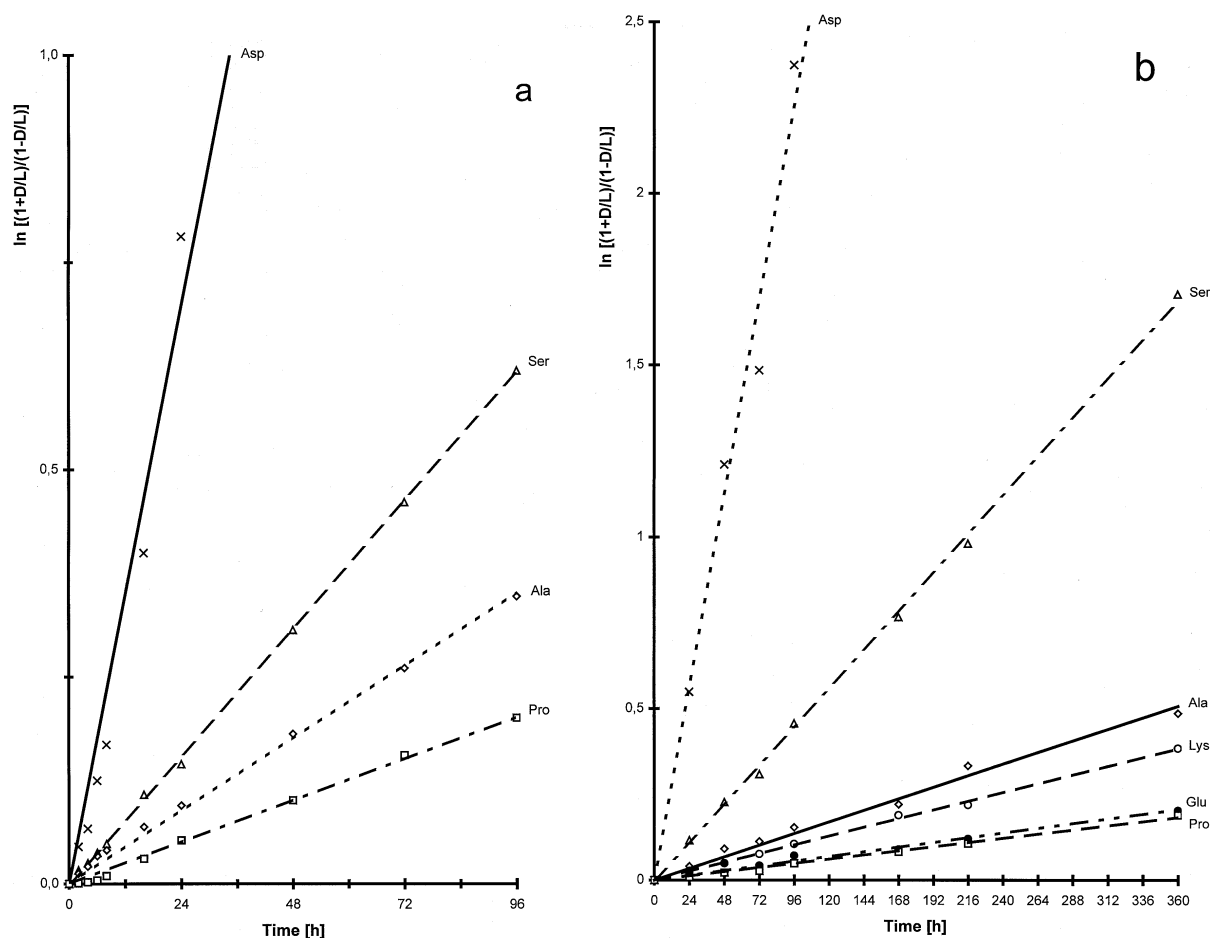
**Table 3** Time-dependent acid-catalyzed isomerization of a standard of L-AAs in 5% (v/v) acetic acid (pH 2.5) at 100 °C; %D = 100 • D/(D+L); data are average of duplicate analyses

Time (h)	0	24	48	72	96	168	216	360
	(%D)							
D-Ala	< 0.1	1.95	4.13	5.64	7.05	10.12	13.89	17.35
D-Val	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	1.26
D-Pro	< 0.1	0.40	1.00	1.40	2.38	3.87	5.28	8.59
D-Ser	< 0.1	5.44	10.06	13.40	17.64	27.70	31.53	42.72
D-Leu	< 0.1	0.24	0.96	1.29	1.75	2.42	3.65	6.08
D-Asp	< 0.1	20.03	35.14	38.85	44.30	45.90	49.63	49.55
D-Met	< 0.1	0.98	1.85	2.97	4.19	7.57	9.36	14.65
D-Phe	< 0.1	1.36	2.67	3.63	5.36	8.97	11.33	16.03
D-Glu	< 0.1	1.26	2.05	2.29	3.43	4.31	5.57	9.17
D-Tyr	< 0.1	0.86	1.83	2.70	3.74	6.23	7.86	11.77
D-Lys	< 0.1	1.35	2.58	3.73	4.96	8.45	10.44	15.97

The plot  $\ln(1+D/L)/(1-D/L)$  against time of the selected standard AAs confirms the results of experiment 1. The data of experiment 1 and 2 prove that the high racemization rate of Pro in matured vinegars cannot be mainly chemically induced. Relative amounts of ca. 12% of D-Pro, the least racemizing AA in vinegar of pH 2.5, should be accompanied by almost completely racemized Asp (see Table 1; t = 72 h and 96 h). However, the relative amount of D-Asp never exceeded 35.3% in any sample we had investigated previously [1]. According to Table 2, amounts of 35% D-Asp, resulting from acid-catalyzed racemization after 48 h of heating, should be accompanied by only 1 % D-Pro, but not amounts of ca. 26% D-Pro, as detected in a matured balsamic vinegar [1].

Further, the ratio of relative amounts of D-Pro:D-Ser:D-Asp was approx. 1:10:35 resulting from standard L-AAs after short times (48 h) of heat exposure (100 °C) in AcOH of pH 2.5 (cf. Table 3). Previously investigated vinegar samples [1] showed ratios of these D-AAs ranging from 1:(0.5-1):(1.2-5). This also indicates that relative amounts of D-Pro determined in such samples are too high to be exclusively the result of acid-catalyzed racemization.

In an experiment of forced ageing by heating a common wine vinegar at 100 °C up to 72 h, the ratios of D/L-Asp and D/L-Ser were not considered in an attempt to explain the mechanism of racemization of L-Pro [2]. An increase of the relative amounts of D-Pro alone on heating vinegar (cf. Table 1), therefore, is no proof for its acid-catalyzed mechanism on racemization in fermented foods. This is supported by the results of others [12-14]. It was concluded that amounts of D-Ala exceeding 50% relative to the corresponding L-enantiomer in Portuguese wines are attributable to residual enzymatic activities in these fermented products [14]. Amounts of D-Pro, however, were not determined in the wine samples.



**Fig. 1** Time-dependent racemization of selected free AAs occurring in (a) red wine vinegar (pH 2.5), and (b) in a standard of L-AAs in aqueous AcOH (pH 2.5) heated at 100 °C; plot of  $\ln \left( \frac{1+D/L}{1-D/L} \right)$ , where D and L are the peak areas of the respective D- and L-enantiomer of an amino acid; note that data for Asp are already out of linear range after 72 h (a) and 96 h (b) of heating, respectively (not shown).

A tentative explanation for the phenomenon observed in matured vinegars [1] was that in the course of the ageing and ripening process microbial racemases are still active and might generate D-Pro. This is supported by the fact that balsamic vinegars are the result of a combined alcoholic and acetic fermentation of grape must by yeasts such as *Zygosaccharomyces* sp. and bacteria such as *Acetobacter aceti*, *A. xylium* and *A. pasteurianus*. Microbial activity, albeit low, is still detectable in aged vinegars [2]. Indeed, microbial Pro racemases have been characterized [15-17]. Relatively high amounts of D-Pro detected in fermented foods have been attributed to racemase activities in starter cultures [1, 18].

In order to prove the effect of the type of acid on racemization of Asp, in experiment 3 rates of isomerization at 100 °C in 5% AcOH were determined in comparison to aqueous HCl (3.2 mM) with identical measured pH of 2.5. The rate of racemization of L-Asp in 5% AcOH (3.2 mM HCl) was 17.6% (16.3%), 27.7% (25.1%) and 31.7% (29.6%) after heat exposure for 24, 48 and 72 h, respectively.

From the data it is concluded that the high rate of racemization of L-Asp is governed mainly by the hydronium ion activity, i.e. the pH value. The associated acid anions (i.e. acetate or chloride) have little effects, if any. Small differences in racemization of L-Asp at 100 °C in aqueous AcOH and HCl of

pH 2.5 (measured at room temperature) are explained by temperature-dependent dissociation of acids resulting in differing hydronium ion activity, as well as the buffer capability of AcOH.

In order to establish further the effect of the hydronium ion activity on racemization, in experiment 4 the rates of racemization of standard L-AAs in 6 M HCl at 100 °C were determined. After 24 h (96h) of heating, amounts of 2.1% (7.8%) D-Asp, accompanied by 1.2% (3.4%) D-Pro and 0.9% (1.8%) D-Ser, were determined. Under these strongly acidic conditions Pro is second-fastest racemizing and Ser is among the least racemized AAs.

In summary, in a standard of L-AAs heated in 6 M HCl racemization decreased in the order Asp>Pro>Glu>Phe>Met>Lys=Ala>Leu>Ser>Tyr>Val. This sequence is in good agreement with the data reported by others [3, 5] who investigated the time-dependent isomerization of free L-AAs and those released from several proteins on heating in 6 M HCl or 6 M deuterium chloride (DCI) at 110 °C.

Experiment 5 was carried out in order to simulate and investigate effects of the specific evaporation and concentration process typically for preparing the must for balsamic vinegar [19]. Effects of glucose and fructose on racemization of L-Pro were investigated, as well as possible catalysis by Cu<sup>2+</sup> ions or participation of acetoin. Experiment 5a revealed that after heating at 100 °C for 24, 48, 72 and 96 h, relative amounts of D-Pro of 3.4%, 11.3%, 16.8%, and 24.2% were formed. The progress of the Maillard reaction (i.e. reaction of amines, such as AAs, with reducing sugars) was indicated by increasing browning of the reaction media. No significant effects of Cu<sup>2+</sup> (experiment 5b) or acetoin (experiment 5c) in addition to those caused by glucose and fructose, were detected after heating for 96 h. In the control (experiment 5d) only 1.1% of D-Pro was formed after 96 h of heating. Consequently, formation of D-Pro as a result of the Maillard reaction has to be considered.

The results indicate that not only kinetics but also the racemization mechanisms of AAs in strong and weak acids are different, and reactions with sugars have to be taken into account.

### *Proposed mechanisms of racemization*

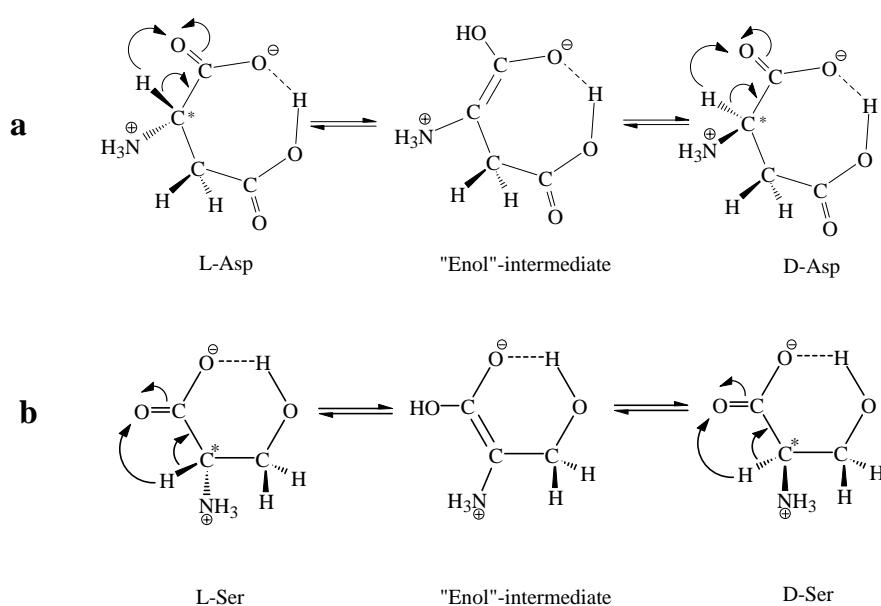
Racemization of free and peptide-bound AAs under alkaline [20-22] and acidic [3-5, 10] conditions as well as microbial-enzymatically catalyzed isomerization in fermented foods [1, 12, 13, 23, 24] have been studied intensively.

In the following we discuss the differences in the racemization mechanisms of Asp, Ser and Pro under weakly and strongly acidic conditions and the effects of the Maillard reaction on the racemization of Pro.

Racemization of free Asp under conditions of total hydrolysis of peptides and proteins in strongly acidic solution (6 M HCl) was explained by formation of a conjugated diendiol system resulting from the abstraction of the C<sup>α</sup>- and the C<sup>β</sup>-protons [3]. This proposed racemization mechanism is assumed to be different from that in weakly acidic solutions close to the isoelectric point (IEP) of Asp at pH 2.77 [25].

At about the IEP the  $\beta$ -carboxyl group ( $\beta$ -COOH) is protonated whereas the  $\alpha$ -COOH is deprotonated representing an  $\alpha$ -carboxylate anion ( $\alpha$ -COO<sup>-</sup>). Therefore, fastest racemization of L-Asp at pH 2-3 might be explained by the formation of a hydrogen bond stabilized seven membered cycle (Fig. 2a). This cyclic intermediate is capable of undergoing keto-enol tautomerism, thus facilitating the abstraction of the C <sup>$\alpha$</sup> -proton (methine hydrogen) similarly to a mechanism proposed for maleic acid [26]. This effect is combined with the electron-withdrawing properties of  $\beta$ -COOH [9].

Notably, Glu at pH 2.5 shows much lower rates of racemization than Asp (cf. Table 2), although the IEP 2.70 of Glu is only slightly lower than that of Asp [25]. This might be attributed to the presence of the C <sup>$\gamma$</sup> -methylene group in Glu, serving as spacer and preventing formation of the cyclic enol intermediate shown for Asp in Fig. 2a. Further, the C <sup>$\gamma$</sup> -methylene group of Glu minimizes the electron-withdrawing action of  $\gamma$ -COOH on the C <sup>$\alpha$</sup> -atom.



**Fig. 2** Proposed mechanisms on formation of hydrogen bridge stabilized planar enol intermediates at pH 2-3 of (a) aspartic acid and (b) serine; asterisks refer to chiral C <sup>$\alpha$</sup> -atoms.

At pH 2-3, in Ser the partly dissociated C <sup>$\alpha$</sup> -carboxyl group might form a hydrogen bridge between the  $\alpha$ -COO<sup>-</sup> and the  $\beta$ -hydroxyl group, resulting in a six membered ring system. This cyclic structure also facilitates abstraction of the C <sup>$\alpha$</sup> -proton and leads to enolization, followed by racemization, in analogy to Asp (Fig. 2b). This hypothesis would explain that Ser is the second-fastest racemizing AA at pH 2.5, a fact that has not been recognized in previous studies [2, 4, 9, 12].

The behaviour of Ser at pH 2.5 is in contrast to conditions in strong acids such as 6 M HCl. Hydrogen bridge formation between the  $\alpha$ -COOH and the  $\beta$ -hydroxyl group of Ser, with no participation of an enolic intermediate, was postulated in order to explain lowest racemization of Ser under strongly acidic conditions [3, 27]. Notably, the enolization mechanism presented in Fig. 2b would also explain enhanced sensitivity towards racemization of Ser with increasing pH. This is a result of increased dissociation of the  $\alpha$ -COOH-group. For example, at pH 7.6 free Ser racemizes 9-10 times faster than Asp [6].

Fast racemization of Pro under strongly acidic (6 M HCl) conditions was explained by formation of a five membered ring with an exocyclic endiol [3, 27]. This not likely to be formed at pH 2-3. Thus steric constraint resulting in shielding of the C<sup>α</sup>-atom is assumed to be responsible for the very low rate of racemization of Pro at pH 2-3. Steric hindrance exerted on the C<sup>α</sup>-hydrogen by the tertiary C<sup>β</sup>-atom is also the rational for lowest racemization of Val (and to less extent Leu) among AAs under both weakly and strongly acidic conditions (cf. Table 2).

The on the first view unexpected intensive racemization of L-Pro on heating with reducing sugars, as described in experiment 5a, is best explained by the Maillard reaction [28]. It is assumed that L-Pro in the Amadori and Heyns compounds, which are formed in the course of the reaction of L-Pro with glucose and fructose, respectively, epimerizes. Amounts of D- and L-Pro are released in subsequent reactions, proceeding with the formation of 2,3- and 1,2-dicarbonyls, as well as melanoidins and flavour compounds [28]. Among AAs, in particular Pro forms relatively stable compounds such as 1-deoxy-1-L-prolino-D-fructose [28, 29]. That intensive Maillard reactions take place in balsamic vinegars is evident from the traditional manufacturing process [19, 30]. The end product is a dark brown and syrupy liquid of about pH 3 which contains between 6% and 18% AcOH (w/v). The total solids are very high (20-70%) and large amounts of glucose and fructose are still present [30], as well as specific flavour compounds, including acetoin [2].

### *Conclusions*

Heating wine vinegar or a standard of L-AAs in aqueous AcOH of pH 2.5 at 100 °C, serving as model for vinegar ageing, lead to the fast racemization of L-Asp, whereas only small amounts of D-Pro were formed. Therefore, an exclusively acid-catalyzed time-dependent isomerization of L-AAs in vinegars should lead to the generation of relative amounts of D-Asp exceeding by far those of D-Pro. This, however, was not the case in any vinegar sample we had investigated previously [1]. Heating of L-Pro together with reducing sugars in 5% AcOH lead to a striking increase of the formation of D-Pro. Consequently, formation and increase of amounts of D-Pro in matured balsamic vinegars is mainly attributed to the Maillard reaction. To a much lower extent, and depending on the particular fermentation conditions, action of microbial racemases [15-17], together with autolysis of microorganisms [1, 23], might contribute to the formation of D-Pro in balsamic vinegars. Acid-catalyzed racemization of Pro plays a minor, if any, role in balsamic vinegars. The findings reported here will make it difficult to draw conclusions from the relative amounts of D-Pro on the age of balsamic vinegars of different origin in terms of years. High amounts of D-Pro, however, are still considered an indicative for maturation.

The studies are of general concern with regard to the discussion on the formation of D-AAs in foodstuffs. Fast acid-catalyzed racemization of Asp and Ser at pH 2.5-3 is of interest since that pH is common for many foodstuffs such as pickled vegetables, pickled meat and fish, as well as wines and fruit juices. This contributes to the formation and intake of D-AAs with the diet.



---

**References**

1. Erbe T, Brückner H (1998) *Z Lebensm Unters Forsch A* 207: 400-409
2. Chiavaro E, Caligiani A, Palla G (1998) *Ital J Food Sci* 10, 329-337
3. Frank H, Woiwode W, Nicholson G, Bayer E (1981) *Liebigs Ann Chem*: 354-365
4. Bada JL (1972) *J Am Chem Soc* 94: 1371-1373
5. Liardon R, Jost R (1981) *Int J Peptide Res* 18: 500-505
6. Steinberg SM, Masters PM, Bada JL (1984) *Bioorg Chem* 12: 349-355
7. Friedman M (1991) Formation, nutritional value, and safety of D-amino acids. In: Friedman M (ed) *Nutritional and toxicological consequences of food processing*. Plenum Press, New York, pp. 447-481
8. Frank H, Nicholson GJ, Bayer E (1977) *J Chromatogr Sci* 15: 174-176
9. Bada JL (1982) *Interdisc Sci Rev* 7: 30-46
10. Neuberger A (1948) Stereochemistry of amino acids. In: Anson ML, Edsall JT (eds) *Advances in protein chemistry*, vol. 4, Academic Press, New York, pp. 297-383
11. Barrow GM (1980) *Physical chemistry*. McGraw-Hill Inc., New York
12. Calabrese M, Stancher B, Riccobon P (1995) *J Sci Food Agric* 69: 361-366
13. Chaves das Neves HJ, Noronha JP (1995) *Fresenius J Anal Chem* 352: 783-787
14. Chaves das Neves HJ, Vasconcelos AMP, Costa ML (1990) Racemization of wine free amino acids as function of bottling age. In: Frank H, Holmsted B, Testa B (eds) *Chirality and biological activity*. Alan R. Liss, Inc., New York, pp 137-143
15. Fisher LM, Albery WJ, Knowles JR (1986) *Biochem* 25: 2529-2537
16. Stadtman TC, Elliott P (1957) *J Biol Chem* 228: 983-997
17. Adams E (1972) Amino acid racemases and epimerases. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, Vol VI. Academic Press, New York, pp 479-507
18. Brückner H, Becker D, Lüpke M (1993) *Chirality* 5: 385-392
19. Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ (eds) (1993) *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*, vol 7. Academic Press, London, pp 4773-4779
20. Friedman M, Liardon R (1985) *J Agric Food Chem* 33: 666-672
21. Liardon R, Hurrell F (1983) *J Agric Food Chem* 31: 432-437
22. Masters PM, Friedman M (1979) *J Agric Food Chem* 27: 507-511
23. Brückner H, Langer M, Lüpke M, Westhauser T, Godel H (1995) *J Chromatogr A* 697: 229-245
24. Brückner H, Hausch M (1989) *Chromatographia* 28: 487-492
25. Lübke K, Schröder E, Kloss G (1975) *Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine*, vol 1. Thieme, Stuttgart
26. Sykes P (1986) *A guidebook to mechanism in organic chemistry*, 6th edn., Longman, London
27. Frank H. (1987) Analysis of amino acid racemization and the separation of amino acid enantiomers. In: Gehrke CW, Kuo KCT, Zumwalt RW (eds) *Amino acid analysis by gas chromatography*, vol 2. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 55-78
28. Ledl F, Schleicher E (1990) *Angew Chem* 102: 597-626; *Int Ed Engl* (1990) 29: 565-594
29. Tressl R, Rewicki D, Helak B, Kamperschröer H (1985) *J Agric Food Chem* 33: 924-928
30. Plessi M, Monzani A, Coppini D (1988) *Agric Biol Chem* 52: 25-30

## **Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for manufacturing**

Thorsten Erbe, Hans Brückner\*

*Institute of Nutritional Science, Department of Food Sciences, Justus-Liebig-  
University, Interdisciplinary Research Center, Heinrich-Buff-Ring 26-32,  
D-35392 Giessen, Germany*

---

### **Abstract**

Using gas chromatography (GC) on a chiral stationary phase, accompanied by high-performance liquid chromatography (HPLC), beers and raw materials used for manufacturing (hops, barley grains, malts) were investigated for the pattern and quantities of amino acid (AA)-enantiomers. Although L-AAs were most abundant, certain D-AAs were detected in all beers and most of the raw materials. Highest amounts of D-AAs were detected in special beers such as Berliner Weisse that underwent bottle-conditioning with lactic cultures, and Belgian fruit beers produced by spontaneous fermentation. It is demonstrated that GC on chiral stationary phases is highly suitable for the quantitative determination of AA enantiomers in beers and raw materials used for manufacturing. Quantities, relative amounts and pattern of AA-enantiomers can serve in particular as chiral markers for the authenticity of special beers.

*Keywords:* D-Amino acids; Racemization; Malt; Beer; Microorganisms; Gas chromatography; Chirasil-L-Val

---

\*Corresponding author: Tel.: +49-641-9939-141; fax: +49-641-9939-149

*E-mail address:* hans.brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de

### 1. Introduction

Beer is defined as an alcoholic beverage from starch-containing raw materials serving as sources for maltose and glucose which are fermented by brewers yeast. In Germany, according to the famous law of purity from 1516, exclusively germinated and kilned barley (malt), hops, water and yeast are allowed to be used as ingredients. An exception is wheat beer which has to be defined as such and where a mixture of wheat and barley malt is allowed to be used [1].

Although barley malt is the most important cereal, also wheat, wheat malt, corn, rice and millet are used as starch-containing adjuncts or extenders and sources for fermentable sugars. Many breeds of barley, and an abundance of malts produced therefrom, are used to influence taste, colour and body of the final product. For example, such malts are designated as Munich malt, Vienna malt, British pale ale malt and roasted black malt [1, 2].

Over the past centuries many countries have developed their own local beer specialties. Germany is famous for its Pilsener, Düsseldorfer Altbier and Bavarian Weissbier. Great Britain stands for ales and stouts. In Belgium fresh fruit like cherries and raspberries are added in amounts of up to 15% to the finished beer followed by a further fermentation to produce a special fruit beer [1, 3-5].

In beer production alcoholic fermentation takes place by the action of selected strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (top fermenting) or *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen (bottom fermenting). Besides *Saccharomyces*, various wild yeasts together with lactic acid bacteria are involved in the brewing process of special local beers. For example, the Belgian lambic and fruit beers are produced by fermentation with a very complex mixture of wild yeasts, including *Brettanomyces lambicus* and *Brettanomyces bruxellensis*, combined with lactic cultures mainly consisting of species of *Pedicoccus* [4, 5]. The characteristic tart taste of German Berliner Weisse is due to the lactic fermentation of the mash with *Lactobacillus delbrueckii*. Some manufacturers also add lactic cultures to the beer right before bottling for secondary fermentation named conditioning [1].

Among the constituents of beers, amino acids are of particular interest. The amounts and pattern of free L-amino acids (L-AAs) in beers, and its enantiomers named D-AAs, are dependent on many factors. They comprise quantities of proteins in the raw materials used for production, activity of cereal proteolytic enzymes in the course of various mashing procedures, and microorganisms involved in the fermentation process.

Identification of sources of D-AAs and estimation of their contribution to the D-AA content of finished beer is a difficult task. It has to be taken into account that the raw materials used for beer production might contain already free D-AAs [6]. Thermal treatment of malt during kiln-drying and/or roasting might also induce conversion of L- into D-enantiomers [7]. This process is usually, but not correctly, referred to as racemization of AAs. In the strict sense racemized AAs consist of exactly equal amounts of the D- and the L-enantiomers. Further, raw materials are inevitably subject of microbial colonization and contamination [8] and might contribute to amounts of D-AAs in beers.

Action of special microbial enzymes, so-called racemases and epimerases, on proteinogenic L-AAs is known to cause formation of their optical antipodes i.e. D-AAs [9]. Autolysis of bacterial peptidoglycan [10] in the course of the fermentation process additionally leads to the release of bonded D-AAs of the cell walls and of free D-AAs occurring in the cytoplasm [11, 12]. D-AAs have also been detected in various yeasts and yeast autolysates [13, 14]. Consequently, D-AAs were detected in different beers [14-16] as well as in other microbially fermented foods [14, 17, 18].

So far, only few systematic investigations of different groups of beers with the aim to quantify AA enantiomers have been carried out [15, 16]. Therefore, the aim of this work was the characterization of beers by quantitative determination of the enantiomeric AA ratios using mainly gas chromatography (GC), complemented by high-performance liquid chromatography (HPLC). Samples of grains, malts and hops were also investigated in order to evaluate their contribution to the D-AA content of beer. Further, the results should be discussed with regard to aspects of beer quality and authenticity.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumental

#### 2.1.1. Gas Chromatography

A Shimadzu GC-14A gas chromatograph (GC) with flame ionization detector (FID) and a Shimadzu GC-17A coupled with a Shimadzu QP-5000 mass spectrometer (MS) (Shimadzu, Kyoto, Japan) were used.

The GC-columns used in both instruments for the separation of AA enantiomers were fused silica Chirasil-L-Val *N-tert*-butyl-L-valine-polysiloxane [19] capillary columns (25 m x 0.25 mm ID; Chrompack, Middelburg, The Netherlands). Carrier gas was helium (Messer Griesheim, Krefeld, Germany, 99.999% purity) at an inlet pressure of 50 kPa (GC 14A) and 80 kPa (GC 17A), respectively. The temperatures of injector and interface were 250°C; samples were injected in split mode (split ratio 1:30).

Temperature program for GC 14A: initial temp. 85°C held for 7 min; heating rate A: 2.0 °C/min to 90 °C; rate B: 2.0 °C/min to 110 °C; rate C: 3.5 °C/min to 160 °C; rate D: 5.0 °C/min to 175 °C held for 1 min; rate E: 2.5 °C/min to 190 °C held for 15 min. Isobaric pressure was 50 kPa.

For temperature and pressure program of GC 17A see ref. [17].

Data acquisition was carried out with a Cromatopac C-R3A integrator (Shimadzu) at the GC-FID and with Class 5000 software and workstation (Shimadzu) at the GC-MS system.

#### 2.1.2. High Performance Liquid Chromatography

For AA analysis by HPLC a HP 1090 Series L (Hewlett Packard HP, Waldbronn, Germany) equipped with a HP 1046A programmable fluorescence detector and a Hypersil ODS2 column were used as

described in detail previously [14]. Data acquisition was carried out with the HP ChemStation for LC software.

### 2.2. Chemicals

Dichloromethane (DCM), 2-propanol (2-PrpOH), 1-PrpOH, acetyl chloride (AcCl), 32% aqueous hydrochloric acid (HCl) (all from Merck, Darmstadt, Germany), methanol (MeOH), 25% aqueous ammonia (NH<sub>3</sub>), *n*-hexane, acetic acid (100% analytical grade, p.a.) (all from Roth, Karlsruhe, Germany), pentafluoropropionic anhydride (PFPA), trifluoroacetic anhydride (TFAA), trifluoroacetic acid (TFA), 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT), cation exchanger Dowex 50 W X8, 200 - 400 mesh, corresponding to a particle size of 0.037 - 0.075 mm, H<sup>+</sup>-form (all from Fluka, Buchs, Switzerland);

sodium hydroxide (NaOH, 99% p.a.) and potassium hydroxide (KOH, 99% p.a.) (from Roth); *N*-isobutyl-D-cysteine (IBDC) and *N*-isobutyl-L-cysteine (IBLC) (Novabiochem, Läuelfingen, Switzerland), *o*-phthalaldehyde (OPA) (p.a., Merck); 0.4 N sodium borate buffer (HP).

An equimolar AA standard H (1 ml sealed ampoules from Pierce, Rockford, Ill., USA) was used, consisting of Gly and the L-enantiomers of alanine (Ala), valine (Val), threonine (Thr), isoleucine (Ile), proline (Pro), serine (Ser), leucine (Leu), Asp, methionine (Met), glutamic acid (Glu), phenylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) lysine (Lys), arginine (Arg), histidine (His) (2.5 mM each) and L-cystine (1.25 mM). The enantiomeric purity of the L-AA standard was >99.9%. As internal standard for GC analysis L-norleucine (L-Nle, Fluka) was used.

### 2.3. Beers and raw materials

Beers (n = 42) in bottles or cans (cf. Table 1) were purchased from local retail outlets or were provided by breweries. Barley grains (n = 4), barley malts and wheat malts (n = 9), and hops (n = 3) were kindly provided by Dr. Hasan Taschan, Giessen. They were not specified with regard to cultivars, brand names, or origin.

### 2.4. Treatment of samples

For GC analysis aliquots (20 ml) of the beer samples were degassed in an ultrasonic device, Model Sonorex Super RK 106 (Bandelin, Berlin, Germany). To aliquots (1-5 ml) the internal standard L-Nle (100 µl of a 10 mM solution in 0.01 M HCl) was added and the pH was adjusted to 2.5 by addition of suitable amounts of 1 M HCl. Samples were subjected to DOWEX 50W X8-400 cation exchanger (particle size 0.037 – 0.075 mm) packed in glass columns (bed volume: 4 cm length x 0.5 cm i.d.). After washing with bidistilled water (10 ml) the AAs adsorbed were eluted with 4 M NH<sub>3</sub> (3 ml) and the eluate was evaporated to dryness under reduced pressure.

Grains, malts and hops were milled with a Mortar Grinder, Model RM 1000 (Retsch, Haan, Germany). Aliquots (10 g) were suspended in 0.1 M HCl (50 ml) and the internal standard L-Nle (200 µl of a 10

mM solution in 0.01 M HCl) was added. After stirring for 20 min on a magnetic stirrer, samples were centrifuged at 3500 x *g* for 15 min in a Model Labofuge 400 centrifuge (Heraeus, Hanau, Germany). Residues were suspended twice in 0.1 M HCl (20 ml) and the procedure was repeated. Supernatants were collected, residues were discarded. Proteins were precipitated by addition of TFA (10 ml). After centrifugation the residues were suspended twice in TFA (3 ml of a 10% aqueous solution, v/v) and centrifuged. Supernatants were combined and extracted with *n*-hexane (3 x 25 ml). The organic phases were discarded and the aqueous phases were evaporated to dryness under reduced pressure on a rotary evaporator. The remaining residues were dissolved in bidistilled water (5 ml), pH 2.5 was adjusted by addition of 1 M NH<sub>3</sub> and samples were subjected to cation exchange treatment as described above.

For HPLC aliquots (5 ml) of the beers were degassed in an ultrasonic device and adjusted to pH 8-10 by addition of 1M NaOH. Then MeOH/ 0.4 N sodium borate buffer (80/20, v/v) was added to give a final volume of 25 ml. Aliquots (1.5 ml) were centrifuged at 1500 x *g* for 20 min in a Micro Centrifuge (Roth) and the supernatants were transferred into the autosampler vials.

### 2.5. Derivatization, analysis and quantification of amino acids

For GC-analysis AA containing residues resulting from cation exchange treatment (see above) were dissolved in 0.1 M HCl (500 µl) and transferred into 1 ml "Reacti-Vials" (Wheaton, Millville, NJ, USA). Samples were evaporated to dryness in a stream of N<sub>2</sub> at 70-80 °C using a heating module ("Thermoblock", Gebr. Liebsch, Bielefeld, Germany) combined with an evaporating unit (Model 18780, "Reacti-Vap", Pierce).

For analysis by GC-FID or GC-MS, AAs of purified samples were converted into their corresponding *N*(*O*)-trifluoroacetyl AA 1-propyl esters or *N*(*O*)-pentafluoropropionyl AA 2-propyl esters as described [17]. Note that Arg, His and cysteine (Cys) as well as tryptophan (if present in samples) could not be determined by GC as a result of the methodology and derivatization chemistry used, and Asn and Gln are hydrolyzed to Asp and Glu, respectively.

Relative amounts of D-AAs were calculated according to equation (1)

$$\% D = 100 \times A_D / (A_D + A_L) \quad (1)$$

where % D is the relative amount of the D-enantiomer, and A<sub>D</sub> and A<sub>L</sub> are the peak areas of the D- or L-enantiomer, respectively.

For quantification response factors of AAs were determined in relation to L-Nle. Equimolar amounts of AAs, including the IS, were injected into the GC-FID or GC-MS system. Response factors were calculated according to equation (2)

$$f_R = A_{AA} / A_{IS} \quad (2)$$

where *f<sub>R</sub>* is the response factor of AA to be determined, A<sub>AA</sub> the peak area of AA to be determined, and A<sub>IS</sub> the peak area of IS obtained from a standard AA mixture (standard H) to which L-Nle was added in equimolar concentration (2.5 mM).

Note that response factors depend on the instruments and detectors used for quantification of AAs. Thus, they had to be determined separately for GC-FID and GC-MS.

Amounts of AA in beers were calculated according to equation (3)

$$c_{AA} = \frac{A_{AA} \times c_{IS}^* \times f_{dil} \times MW_{AA}}{A_{IS} \times f_R \times 1000} \quad (3)$$

where  $c_{AA}$  is the concentration of an AA in sample [mg/l],  $A_{AA}$  the peak area of AA,  $A_{IS}$  the peak area of IS,  $f_R$  the response factor of AA,  $c_{IS}^*$  the concentration of IS [mol/l],  $f_{dil}$  the correction factor for dilution with HCl used for pH adjustment, and  $MW_{AA}$  the molecular weight of AA [g/mol].

The limit of quantitative determination of AAs in beer and raw materials ranged from 0.57 mg/l (Thr) to 1.49 mg/l (Met) using the FID and from 0.06 mg/l (Ala) to 0.39 mg/l (Met) using the MS detector.

For the determination of the repeatability of the GC-methods work-up and analysis of one sample was repeated three times. Using the FID for quantification the relative standard deviation (RSD) ranged from 1.1% to 4.8 % for Asp, Met, Pro, Phe, Glu, Lys and Tyr. The other AAs showed a RSD of 6.5 – 9.2%. In the MSD mode the RSD values ranged from 1.1% (Asp) to 7.2% (Gly). Recoveries of the AAs were determined by addition of standard H (250  $\mu$ l) to a beer sample prior to the work-up procedure. Recoveries ranged from 76% (Met) to 110% (Phe).

Automated derivatization chemistry of AAs using OPA-IBL(D)C, and analysis of derivatives by HPLC were performed as described previously [14]. Quantification was carried out via external standard calibrations. The limit of quantitative determination of AAs using HPLC ranged from 0.04 mg/l (D-Thr) to 0.53 mg/l (L-Orn) for IBLC-derivatives and from 0.08 mg/l (L-Thr) to 0.68 mg/l (L-Lys) for IBDC-derivatives.

### 3. Results and discussion

A summary of quantities of the AAs determined in beers and raw materials is given in Table 1. As can be seen D-AAs were detected in all beers and in most of the raw materials. A remarkable exception was a black malt where no D-AAs were found and amounts of free L-AAs were low (598 mg/kg) in comparison to pale malts (2500-3842 mg/kg). This is attributed to the reaction of free L- and D-AAs with reducing sugars. This leads to intense generation of Maillard products during the roasting process resulting in loss of AAs and formation of black malt. In light-coloured malts, however, D-AAs were detected. No significant differences in the AA pattern and the enantiomeric distribution of AAs were found among barley malts and wheat malts.

In comparison to barley and wheat malts, barley grains contained much lower amounts of free L- and D-AAs (cf. Tab. 1). The major free AA in barley was L-Glu (60-85 mg/kg), followed by L-Phe (40-72 mg/kg) and L-Asp (28-62 mg/kg). In malt samples, however, L-Pro was the most abundant free AA (400-700 mg/kg), followed by L-Phe (350-630 mg/kg) and L-Glu (220-320 mg/kg). This increase is a result of the action of exo- and endopeptidases on grain proteins in the malting process.

## 6 Anhang

**Table 1** Absolute (mg/kg<sup>a</sup> or mg/l<sup>b</sup>) and relative (%) amounts of amino acids (AAs) in raw materials and beers determined by GC<sup>1</sup>; n = number of samples investigated (data are average of duplicate analyses of each sample)

	Raw materials <sup>a</sup>			Top-fermented beers <sup>b</sup>			Bottom-fermented beers <sup>b</sup>		
	Hops (n = 3)	Barley (n = 4)	Malt (barley/ wheat) (n = 9)	Lambic beers <sup>3</sup> (n = 6)	Altbier and ales <sup>4</sup> (n = 11)	Wheat beers <sup>5</sup> (n = 11)	Pilsener and lagers <sup>6</sup> (n = 7)	Black beers <sup>7</sup> (n = 3)	Strong beers <sup>8</sup> (n = 4)
(D+L)-AAs	2800-4000	300-480	600-3800	500-1500	500-2040	560-1080	1280-2260	750-1440	1440-5000
D-AAs	23.0-48.4	1.9-6.6	0-47.9	6.4-41.6	6.5-41.6	11.3-96.3	8.3-29.8	8.9-24.9	13.2-50.8
% D-AAs <sup>2</sup>	1.1-1.2	0.4-1.8	0-1.6	1.0-5.3	0.9-2.7	1.3-11.3	0.7-1.3	1.2-1.8	0.9-1.2

<sup>1</sup>Arg, His, Trp and Cys not determinable, <sup>2</sup>Calculation of relative amounts was carried out according to the equation % D-AAs = 100 x D/(D+L), shown here are the lowest and highest values taken from the average amounts of the single samples; <sup>3</sup> including two kriel (cherry)-lambics, one pecheresse (peach)-lambic, one framboise (raspberry)-lambic and two geuze (blended)-lambics, all products of Belgium; <sup>4</sup> comprising five samples of German "Altbier", three English ales and three Irish ales; <sup>5</sup> including three samples of "Helles Weißbier", one sample of "Kristall-Weizen", three samples of "Dunkles Weißbier", all products of Bavaria, Germany, and four samples of "Berliner Weisse", Berlin, Germany; <sup>6</sup> comprising three samples of German Pilsener, one Pilsener of the Czech republic, one Pilsener of Poland, one German lager and one American lager; <sup>7</sup> black beers ("Schwarzbier") of Germany; <sup>8</sup> including two French, one Belgian and one German beer

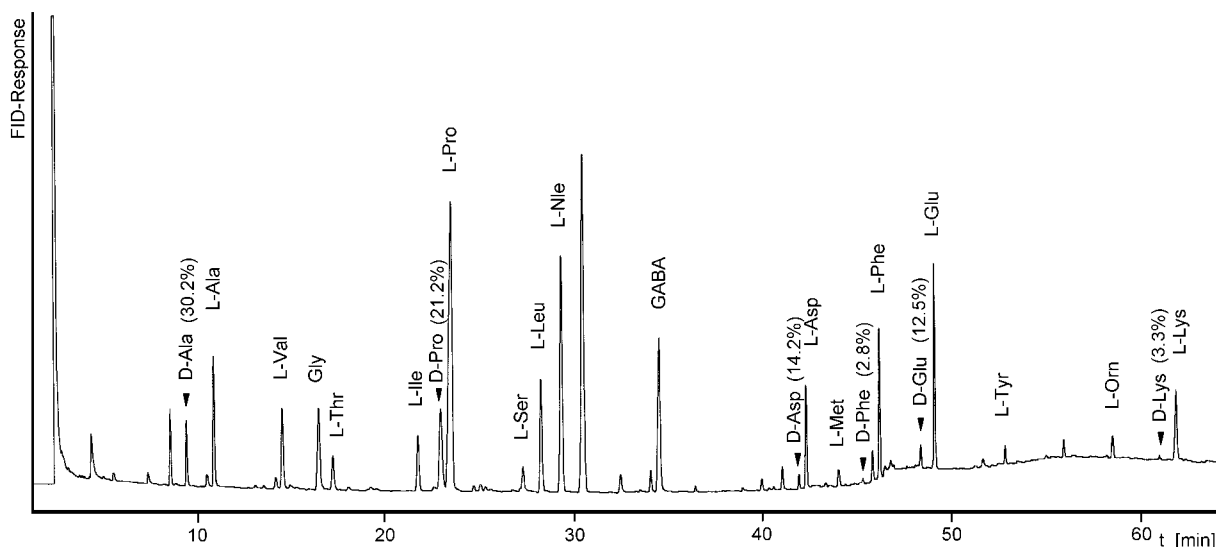
Low but significant amounts of D-AAs have been recognized to occur naturally in plants [6]. Therefore, the D-AAs found in barley grains might be attributed to endogenous formation, or to uptake of D-AA from soils. It is also known that the grains used for malt production are always contaminated with microorganisms [8] which are potential sources of D-AAs [10]. During steeping and germination, which is not carried out aseptically, not only grain-specific exo- and endopeptidases but also microbes and their racemases [9] are activated. The L-AAs released from the grain proteins could be partly transformed into D-AAs by microbial racemases. This could explain the higher relative and absolute amounts of D-AAs determined in malts in comparison to grains. Further, free and conjugated D-AAs have been detected in germinating seeds [20, 21].

In the dried hop blossoms only low relative amounts of D-Asp and D-Glu, besides the common L-AAs, were detected (cf. Table 1). Again, endogeneous formation, uptake from soil and microbial contamination, alone or together, might be the explanations for the presence of D-AAs. Since relatively low amounts of hops are added to the wort (0.1 - 0.5 kg per 100 liters) the contribution to the D-AA content of beer is negligible.

In all beers the D-enantiomers of Ala, Asp and Glu were detected. These D-AAs are considered as chemical markers for microbial activity [14, 17, 18]. Small amounts of these D-AAs might originate from the grains and/or malts being fermented (cf. Table 1). However, since the raw materials are used in amounts of about 12% (w/w) for the production of common beers comprising ca. 5% alcohol (v/v) [1, 2] their contribution to the D-AA content of beer is probably low.

Individual groups of beer showed very deviating and characteristic AA pattern including ratios of enantiomers. Highest amounts of D-AAs were determined in a special German beer called Berliner Weisse. This is a top fermented wheat beer, low in alcohol (2.5 – 3.7% v/v), which is subjected to a secondary lactic fermentation in order to make it tart and spritzig [2]. The chromatogram of Berliner Weisse beer no. 1, with artificial woodruff flavour added, is presented in Fig. 1.





**Fig. 1.** GC-Chromatogram of a Berliner Weisse beer (no. 1), flavoured with woodruff; AAs were separated on Chirasil-L-Val as trifluoroacetyl AA 1-propyl esters; for chromatographic conditions see Experimental

Very high amounts of D-Pro were detected, as well as high relative amounts of D-Ala, D-Asp and D-Glu. Quantitative data of Berliner Weisse no. 2, of the same manufacturer, with artificial raspberry flavour added, are shown in Table 2.

**Table 2** Quantitative data of chiral amino acid (AA) analysis of selected beers obtained by GC-analysis

AA	Berliner Weisse (no. 2)			Framboise lambic			Pilsener			Pale ale			Bavarian wheat beer			Strong beer		
	Amount			Amount			Amount			Amount			Amount			Amount		
	L	D	D	L	D	D	L	D	D	L	D	D	L	D	D	L	D	D
	[mg/l]	[mg/l]	[%]	[mg/l]	[mg/l]	[%]	[mg/l]	[mg/l]	[%]	[mg/l]	[mg/l]	[%]	[mg/l]	[mg/l]	[%]	[mg/l]	[mg/l]	[%]
Ala	52.2	22.5	30.1	61.2	10.9	17.3	273.5	4.2	1.5	72.1	2.4	3.2	83.5	2.6	3.0	250.0	6.7	2.6
Val	30.9	n.d.	-	44.5	n.d.	-	128.3	n.d.	-	22.6	n.d.	-	73.2	n.d.	-	188.0	n.d.	-
Gly <sup>b)</sup>	47.8	-	-	29.6	-	-	99.6	-	-	58.2	-	-	51.3	-	-	145.5	-	-
Thr	13.3	n.d.	-	20.2	n.d.	-	9.3	n.d.	-	9.2	n.d.	-	7.9	n.d.	-	15.5	n.d.	-
Ile	22.9	n.d.	-	24.7	n.d.	-	35.6	n.d.	-	9.0	n.d.	-	26.3	n.d.	-	44.5	n.d.	-
Pro	194.3	51.9	21.1	91.7	0.6	0.7	623.7	1.7	0.3	381.7	1.5	0.4	393.8	0.8	0.2	662.5	2.0	0.3
Ser	12.0	n.d.	-	22.1	n.d.	-	30.2	n.d.	-	41.1	n.d.	-	15.5	n.d.	-	38.9	n.d.	-
Leu	45.2	n.d.	-	41.6	n.d.	-	60.7	n.d.	-	19.9	n.d.	-	68.4	n.d.	-	84.8	n.d.	-
GABA <sup>b)</sup>	77.0	-	-	28.1	-	-	123.5	-	-	30.6	-	-	83.8	-	-	193.6	-	-
Asp <sup>c)</sup>	30.1	5.2	14.7	622.2	10.3	1.6	43.3	3.9	8.3	27.6	4.3	13.5	33.2	3.1	8.5	68.3	7.3	9.7
Met	9.7	n.d.	-	13.6	n.d.	-	14.4	n.d.	-	5.4	n.d.	-	11.5	n.d.	-	21.1	n.d.	-
Phe	39.3	1.3	3.2	27.2	n.d.	-	75.7	n.d.	-	18.5	1.5	7.5	84.7	1.2	1.4	101.9	3.4	3.2
Glu <sup>d)</sup>	53.9	6.6	10.9	36.4	2.2	5.7	96.1	3.1	3.1	41.0	2.5	5.7	70.0	4.6	6.2	116.5	5.9	4.8
Tyr	5.7	n.d.	-	14.6	1.0	6.4	70.0	n.d.	-	20.9	n.d.	-	55.4	1.7	3.0	71.3	n.d.	-
Orn	6.5	n.d.	-	3.1	n.d.	-	6.1	n.d.	-	7.1	n.d.	-	5.8	n.d.	-	10.2	n.d.	-
Lys	31.6	1.3	4.0	8.6	n.d.	-	85.4	n.d.	-	19.9	n.d.	-	15.5	n.d.	-	52.4	n.d.	-
$\Sigma$	672.4	88.8	11.7	1089.4	25.0	2.3	1775.4	12.9	0.7	784.8	12.2	1.5	1079.8	14.0	1.3	2065.0	25.3	1.2

<sup>a), b)</sup> non-chiral AAs; n.d.= not detected, <sup>c), d)</sup> sum of (Asp+Asn) and (Glu+Gln), respectively (see experimental); Arg, His, Trp and Cys not determinable

Interestingly, in another Berliner Weisse (no. 3) only traces of D-Pro were detected, but high relative amounts of other D-AAAs. The latter special beer was produced by a different manufacturer using differing fermentation conditions. The manufacturer of the Berliner Weisse no. 1 and 2 uses mixed

strains of top fermenting yeast together with mixed strains of *Lactobacillus delbrueckii*. These mixed cultures are added to equal parts of barley malt and wheat malt, together with water and a proportion of wort matured for 3-6 months. Then, fermentation is conducted for 3-4 days at 20-25 °C. After maturation for 3-6 months at 13-25 °C the brew is centrifuged. Then an inoculum named *Kräusen* is added, which represents a portion of partly fermented wort, together with *Lactobacillus delbrueckii*. Finally, the beer is bottled and warm conditioning at  $\geq 20$  °C for 3-4 weeks follows before release [1].

In contrast, the manufacturer producing Berliner Weisse no. 3 uses pure cultures of both yeast and *Lactobacillus delbrueckii* for fermentation. Prior to bottling only *Kräusen* but no lactic cultures are added followed by maturation of the brew for at least 3 months [1].

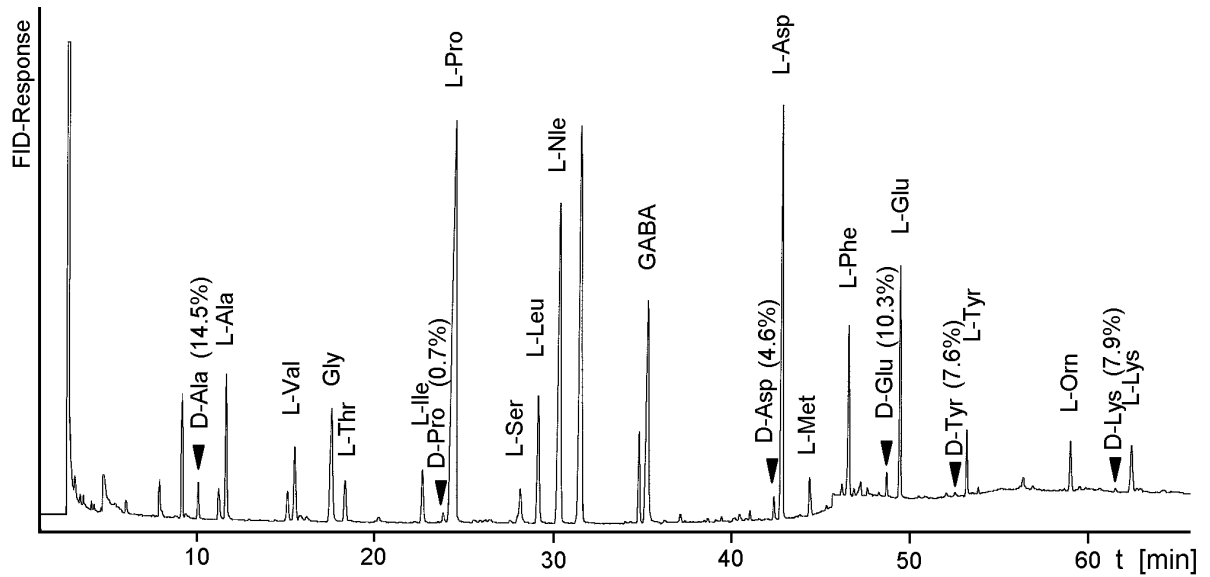
Thus, it is most likely that the strains of *Lactobacillus delbrueckii* added for secondary fermentation (bottle conditioning) are responsible for the racemization of L-Pro in the Berliner Weisse no. 1. Indeed, there is evidence that certain strains of *Lactobacillus* have a Pro-racemase, for high amounts of Pro have been detected in fermented dairy products [14, 22].

In lambic beers the typical markers D-Ala, D-Asp, D-Glu and D-Pro were detected, as well as D-Tyr, D-Arg, D-Ser and/or D-Lys. High amounts were observed in particular in so-called fruit lambics (cf. Fig. 2 and Fig. 3 and Table 2). Due to the addition of fresh fruits or fruit juices, the AA pattern of lambics is distinct from that of common beers. In beers exclusively made from barley and/or wheat or their respective malts, L-Pro is the major AA. In contrast, L-Asp or L-Asn are the most abundant L-AAs in fruit beers manufactured with addition of cherries (kriek-lambic, Fig. 2), peaches (pecheresse lambic, cf. Fig. 3), or raspberries (frambiose lambic, Table 2).

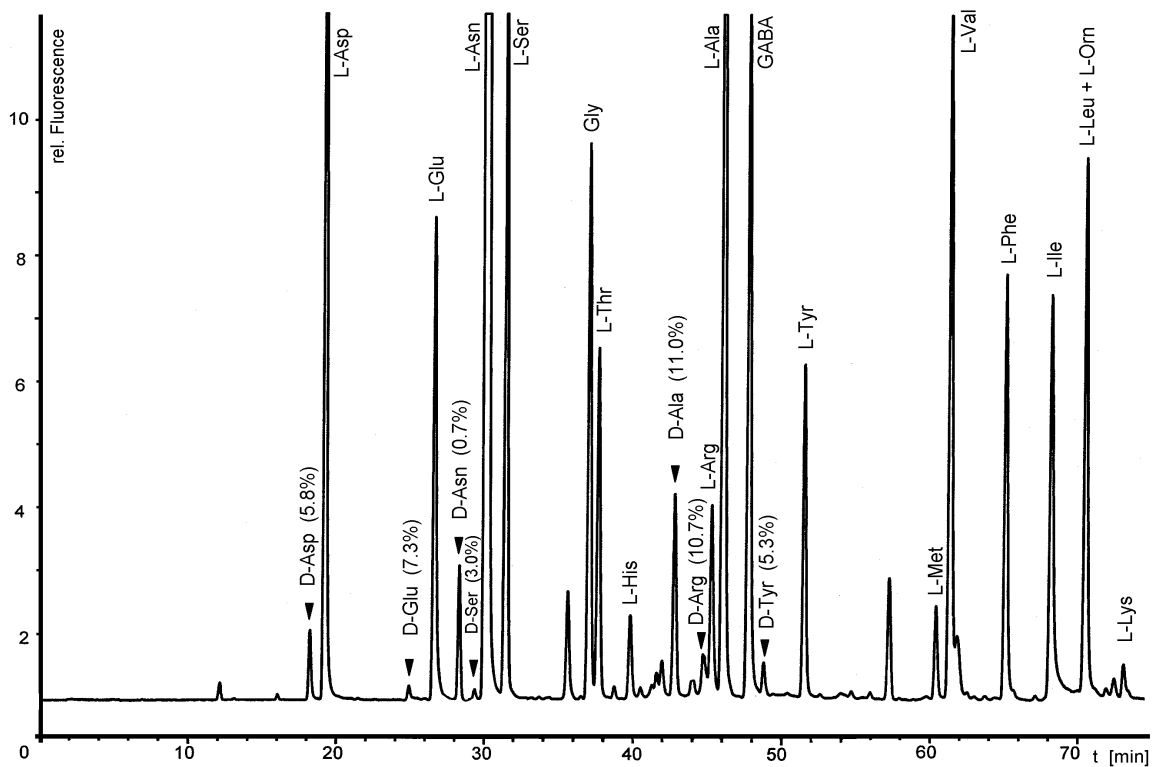
GC-analysis of AA cannot discriminate between Asp and Asn originally present in samples (as well as between Glu and Gln) due to the hydrolysis of the amides under the acidic derivatization conditions used (see Experimental). Therefore, AA analysis of fruit lambics via HPLC after derivatization with OPA-IBLC or OPA-IBDC [14] was carried out. It revealed that L-Asn was the major AA (356-912 mg/l), at least in these beers (cf. Fig. 3).

In comparison to special beers, the common lagers, ales and Pilsener beers contain lower absolute and relative amounts of D-AAs (cf. Table 2). Therefore highly sensitive and specific GC-SIM-MS was used for quantification.

For GC-FID, TFA-derivatives were analyzed in order to circumvent problems arising from the presence of impurities (e.g. PFPAA contains frequently ca. 1% TFAA). This problem does not occur in the SIM-MS detection because of preselection of characteristic fragments for the PFP-derivatives only.

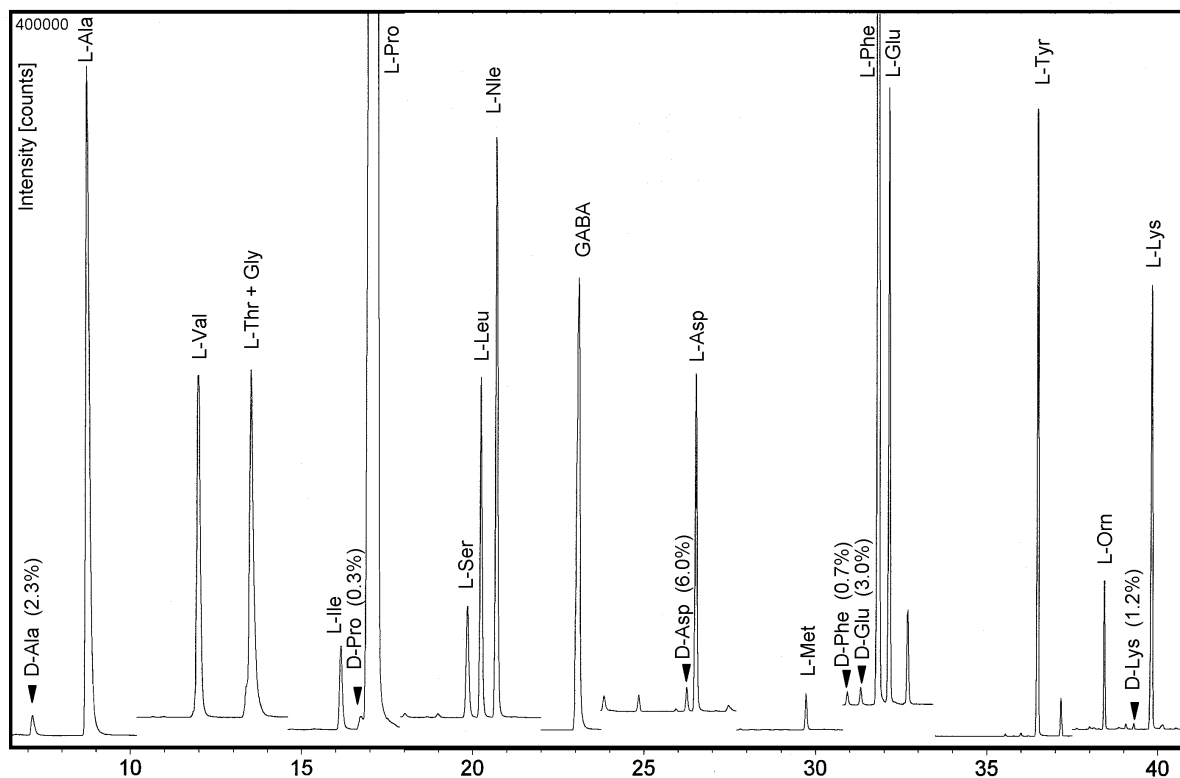


**Fig. 2.** GC-Chromatogram of a Kriek-lambic beer; AAs were separated on Chirasil-L-Val as trifluoroacetyl AA 1-propyl esters; for chromatographic conditions see Experimental



**Fig. 3.** HPLC-Chromatogram of a Pecheresse-lambic beer; AAs were separated on ODS2 Hypersil as OPA-IBLC derivatives; for chromatographic conditions see Experimental

The typical chromatogram of a German lager beer is shown in Fig. 4. The total AA content of German lagers and Pilseners ranged from 1275 to 2260 mg/l, whereas British ales had considerably lower amounts of 553-785 mg/l. In wheat beers moderate amounts of AAs ranging from 560 to 1080 mg/l were detected (cf. Table 1 and Table 2).



**Fig. 4.** GC-SIM-MS-Chromatogram of a German lager beer; AAs were separated on Chirasil-L-Val as pentafluoropropionyl AA 2-propyl esters; for chromatographic conditions see Experimental

Absolute amounts of D-AAs did only exceed 30 mg/l in Berliner Weisse beers, certain lambic beers and strong beers. In the latter beers, however, the relative amounts of D-AAs were as low as in common lager beers. This indicates that the higher absolute amounts of D-AAs of strong beers are correlated with the higher original gravities of these beers (cf. Table 2).

In a previous study the AA content of wort and beer was investigated by HPLC [23]. Although the method applied did not provide enantiomeric separation of AAs, and Pro could not be determined by the methodology used, the results are in good agreement with our quantitative data.

In another investigation the enantiomers of Pro, Leu and Phe were determined quantitatively in beers [16]. Limitations on chiral resolution of three hydrophobic AAs are attributed to the two-dimensional HPLC-method used. Total amounts of these AAs, in particular those of Pro, reported in [16] were much lower in comparison to the data presented in this work and those reported in the literature [23-25].

In a pale ale 2 mg/l total Pro, 1 mg/l total Phe, and 0.4 mg/l total Leu were determined [16]. In the same brand of beer (cf. Table 2) quantities of Leu, Phe and Pro, determined by GC, were 20-fold and 150-fold, respectively, higher than those reported for pale ale [16].

Amounts of total Pro, Leu and Phe reported in the literature are as follows: barley malts 720-786 mg Pro/kg, 134-180 mg Leu/kg and 102-126 mg Phe/kg [25]. Analyses of wort provided values of 122.5 mg Leu/l and 92.1 mg Phe/l (Pro not determinable as a result of the method used) [23]. Common

beers contain ca. 400 mg Pro/l, 3-60 mg Leu/l and 5-99 mg Phe/l [24]. Further, in our investigations we could not detect D-Leu in any beer sample (n = 42) by sensitive and specific GC-methods.

### **4. Conclusions**

GC on chiral stationary phases is highly suitable for the quantitative determination of AA enantiomers in beers and raw materials used for manufacturing. Although L-AAs were most abundant, certain D-AAs were detected in all beers.

Quantities and pattern of AA-enantiomers are strongly dependent on raw materials used and, in particular, on brewing processes employed and microorganisms involved. Raw materials contribute to a minor (grains, malt) or negligible (hops) extent to the D-AA content of beer. Possibly, D-AAs are also formed in the course of the non-enzymatic browning or Maillard reaction on heating malt, mash and wort [26].

Highest amounts of D-AAs were determined in special beers (Berliner Weisse) subjected to long maturation and bottle conditioning with lactic cultures. Exceptionally high amounts of D-Pro in these beers are attributed to the action of a bacterial racemase [9]. Belgian fruit beers fermented with wild yeasts and a complex bacterial flora also comprise high amounts of D-AAs. Further, addition of fresh cherries, peaches or raspberries, or their respective juices, alters the AA composition of these beers significantly. Thus, quantities, relative amounts and pattern of AA-enantiomers can serve as indicatives for authenticity and quality of beers.

Finally, it should be emphasized in this context that negative health claims possibly drawn from the occurrence of D-AAs in beers, or foods in general, taking quantities and realistic food intake into account, lacks experimental evidence [27, 28]. D-AAs are common in the diet and occur, in part in high amounts, in particular in fermented foods. D-AAs ingested with the diet are effectively oxidized by D-AA oxidase localized in particular in the kidneys, as well as other organs and tissues of the body, providing 2-oxo acids which are further metabolized. Varying amounts of D-AAs are also permanently excreted with the urine [28-30].

### **Acknowledgements**

We thank Mrs. K. Thummes, Mrs. P. Gross and Mr. J. Knochenhauer for contributing to parts of the work.

---

**References**

- [1] M. Jackson, Michael Jackson's Beer Companion, Duncan Baird Publishers, London, 1994.
- [2] R. Protz, The Ultimate Encyclopedia of Beer, Carlton Books, London, 1995.
- [3] H.O. Schultze-Berndt, Brauwelt 19/20 (1995) 938.
- [4] A. Piendl, Brauwelt 19/20 (1995) 942.
- [5] J. De Keersmaecker, Scientific Am., 275 (1996) 74-80.
- [6] H.Brückner and T. Westhauser, Chromatographia, 39 (1994) 419.
- [7] F. Hayase, H. Kato and M. Fujimaki, Agric. Biol. Chem., 43 (1979) 2459.
- [8] P. Biovin, Brauindustrie/Brewing Industry, 83 (1998) 495.
- [9] E. Adams, in E.D. Boyer (Editor) The enzymes, Vol VI. Academic Press, New York, 1972, p 479.
- [10] K.H. Schleifer and O. Kandler, Bacteriol. Rev., 36 (1972) 407.
- [11] H.Brückner, D. Becker and M. Lüpke, Chirality, 5 (1993) 385.
- [12] A. Schieber, H. Brückner and J.R. Ling, Biomed. Chromatogr., 13 (1999) 46.
- [13] S.K. Bhattacharyya and A.B. Banerjee, Can. J. Microbiol., 15 (1969) 1107.
- [14] H. Brückner, M. Langer, M. Lüpke, T. Westhauser and H. Godel, J. Chromatogr. A, 697 (1995) 229.
- [15] T. Erbe, K. Thummes and H. Brückner, in V. Gaukel and W.E.L. Spieß (Editors), 3rd Karlsruhe Nutrition Symposium, European Research towards Safer and Better Food, Proceedings Part 2, October 18-20 1998, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, Germany 1998, p. 45.
- [16] K.H. Ekborg-Ott and D.W. Armstrong, Chirality, 8 (1996) 49.
- [17] T. Erbe and H. Brückner, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 207 (1998) 400.
- [18] H. Brückner and M. Hausch, Chromatographia, 28 (1989) 487.
- [19] H. Frank, G.J. Nicholson and E. Bayer, J. Chromatogr. Sci., 15 (1977) 174.
- [20] T. Ogawa, M. Fukuda and K. Sasaoka, Biochim. Biophys. Acta, 297 (1973) 60.
- [21] T. Robinson, Life. Sci., 19 (1976) 1097.
- [22] H. Brückner, P. Jaek, M. Langer and H. Godel, Amino Acids, 2 (1992) 271.
- [23] H. Garza-Ulloa, R. Garza Cantú and A.M. Canales Gajá, J. Am. Soc. Brew. Chem., 44 (1986) 47.
- [24] W.A. Hardwick, Handbook of Brewing, Dekker, New York 1995.
- [25] A.J. Wieg, in J.R.A. Pollock (Editor), Brewing Science, Vol. 3, Academic Press, London 1987, Ch. 5, p. 560.
- [26] T. Erbe and H. Brückner, Eur. Food Res. Technol. (2000) in press.
- [27] A. Schieber, H. Brückner, M. Rupp-Classen, W. Specht, S. Nowitzki-Grimm and H.G. Classen, J Chromatogr B, 691 (1997) 1.
- [28] W. Heine, K. Wutzke and U. Drescher, Clin. Nutr., 2 (1983) 31.
- [29] H. Brückner H, S. Haasmann and A. Friedrich, Amino Acids, 6 (1994) 205.
- [30] D.W. Armstrong, M.P. Gasper, S.H. Lee, J. Zukowski and E. Ercal, Chirality, 5 (1993) 375.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Hans Brückner für Überlassung des Themas und die engagierte Förderung der vorliegenden Arbeit. Besonders danke ich ihm für die stets konstruktive Diskussionsbereitschaft, die maßgeblich zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Hubertus Brunn bedanke ich mich für die Zweitkorrektur.

Bei Herrn Prof. Dr. Erich Eigenbrodt bedanke ich mich für die Drittkorrektur.

Meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor, insbesondere Frau Angelika Schneidewind, Herrn Dr. Jochen Kirschbaum, Herrn Dipl. oec. troph. Andreas Jaworski und Herrn Dr. Klaus Moch danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Bei Herrn Dr. Ralf Pätzold bedanke ich mich herzlich für seine Freundschaft und Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Hasan Taschan danke ich für die Überlassung von Untersuchungsmaterial und seine Hilfsbereitschaft in lebensmittelrechtlichen Fragen.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern und auch meinen Großeltern, die durch ihre ständige Unterstützung meiner Ausbildung diese Arbeit erst ermöglicht haben, sowie meiner Lebensgefährtin Frau Dipl. Ing. Jutta Schmidt.





## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Thorsten Erbe  
Alte Straße 10  
35435 Wettenberg - Wißmar  
geb. am 13.05.1970  
in Weinbach  
ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulbildung:

1976 - 1980      Grundschule in Weinbach  
1980 - 1989      Gymnasium Philippinum in Weilburg  
Abitur: 18.05.1989

### Wehrersatzdienst:

seit 12.06.1988 freiwilliger Helfer im zivilen  
Katastrophenschutz Technisches Hilfswerk,  
Ortsverband Weilburg

### Hochschulausbildung:

10/1989 - 09/1991      Studium der Chemie an der Justus-Liebig-Universität  
Gießen  
10/1991 - 04/1996      Studium der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften  
an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
15.04.1996      *Studienabschluß:* Diplom Oecotrophologe  
seit 01.06.1996      Dissertation am Institut für Ernährungswissenschaft,  
Professur für Lebensmittelwissenschaften, der Justus-  
Liebig-Universität Gießen, betreut durch Prof. Dr. Hans  
Brückner  
26.10.1999      Einreichung der Dissertation zur Begutachtung  
11.02.2000      Disputation