

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-3-190-196>

Поступила 22.07.2021

Поступила после рецензирования 15.09.2021

Принята в печать 25.09.2021

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ОПТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРОВ АМИНОКИСЛОТ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Князева А. С.*, Утьянов Д. А., Куликовский А.В., Курзова А. А.

Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

D-энантиомеры, рацемизация, ВЭЖХ, хиральный агент

АННОТАЦИЯ

Пищевая продукция претерпевает большой спектр химических изменений в процессе ее технологической обработки и хранения. В результате таких реакций могут образовываться как новые химические соединения, так и оптическая изомеризация уже присутствующих в составе соединений. Ко второму случаю относится образование D-энантиомеров аминокислот из их L-форм. D-формы аминокислот не только не обладают биологической ценностью для организма, но и зачастую оказывают негативное влияние на человеческий организм из-за невозможности их метаболизировать и, как следствие, их накопления в организме. Целью работы было исследование количественного содержания D-изомеров аминокислот в молоке прошедшем процессы ультрапастеризации и молочных продуктах на бактериальной закваски. Результаты исследований показали, что в обоих случаях рассмотренных технологических приемов происходит изомеризация аминокислот. Наибольшая степень изомеризации отмечена в образцах кефира относительно других образцов. Однако из полученных результатов нет возможности оценить, какая аминокислота в наибольшей степени подвержена процессу рацемизации, т. к. разные образцы содержали разные D-изомеры аминокислот. Наименьшее количество D-изомеров обнаружено в молоке, которое не подвергалось никаким промышленным технологическим обработкам. Исследования показали, что технологическая обработка молока неминуемо приводит к образованию D-изомеров аминокислот, а это в свою очередь как минимум снижает пищевую и биологическую ценность продукта, что делает необходимым более глубокие исследования в данном направлении для установления наиболее важных факторов процесса рацемизации аминокислот пищевых продуктов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по Государственному заданию ФНИ-№ FNEN-2019-0009 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Received 22.07.2021

Accepted in revised 15.09.2021

Accepted for publication 25.09.2021

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

STUDIES OF THE CONTENT OF OPTICAL ISOMERS OF AMINO ACIDS IN FOOD

Aleksandra S. Knyazeva*, Dmitry A. Utyanov, Andrey V. Kulikovskii, Anastasiya A. Kurzova

V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

KEY WORDS:

D-enantiomers, racemization, HPLC, chiral agent

ABSTRACT

Food products undergo a wide range of chemical changes during their processing and storage. As a result of such reactions, both new chemical compounds and optical isomerization of compounds already present in the composition can be formed. The second case concerns the formation of D-enantiomers of amino acids from their L-forms. D-forms of amino acids not only have no biological value for the body, but also often have a negative effect on the human body due to the impossibility of metabolizing them and, as a consequence, their accumulation in the body. The aim of the work was to study the quantitative content of D-isomers of amino acids in milk that passed the ultra-pasteurization process and dairy products based on bacterial starter culture. The research results showed that in both cases of the considered technological methods, amino acid isomerization occurs. The highest degree of isomerization was observed in kefir samples relative to other samples. However, from the results obtained, it is not possible to estimate which amino acid is most susceptible to the racemization process, since different samples contained different D-isomers of amino acids. The smallest amount of D-isomers is found in milk that has not undergone any industrial processing. Studies have shown that technological processing of milk inevitably leads to the formation of D-isomers of amino acids, and this, in turn, at least reduces the nutritional and biological value of the product, which makes it necessary to conduct deeper studies in this direction to establish the most important factors in the process of racemization of amino acids in food products.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FNEN-2019-0009 of the state assignment of the V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of RAS.

1. Введение

Пищевая продукция содержит множество ксенобиотиков эндогенного и экзогенного происхождения, которые должны нормироваться, поскольку они потенциально или дока-

зано обладают негативными свойствами для человеческого организма. Ксенобиотики экзогенного происхождения образуются в пищевой продукции в результате различных технологических обработок. Попадая во внутрь, ксенобиотики

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Князева, А.С., Утьянов, Д.А., Куликовский, А.В., Курзова, А.А. (2021). Исследования содержания оптических изомеров аминокислот в пищевых продуктах. *Пищевые системы*, 4(3), 190-196. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-3-190-196>

FOR CITATION: Knyazeva, A.S., Utyanov, D.A., Kulikovskii, A.V., Kurzova, A.A. (2021). Studies of the content of optical isomers of amino acids in food. *Food systems*, 4(3), 190-196. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-3-190-196>

оказывают токсичное воздействие на организм. Во время метаболизма эндогенных и экзогенных соединений образуются производные ксенобиотиков — метаболиты, которые повышают восприимчивость к нейродегенеративным заболеваниям во взрослом возрасте или в развивающейся нервной системе [1,2]. К ксенобиотикам относят не только пестициды, радионуклиды, синтетические красители, но и энантиомеры аминокислот.

Аминокислоты являются основой ферментов, рецепторов, антител, сигнальных молекул, гормонов и множества других важных белковых структур во всех живых организмах. Всего описано 20 аминокислот с протеогенной способностью. Их энантиомерные аналоги, D-аминокислоты, считались нефункциональными и не присутствовали в естественных условиях в живых организмах. Однако исследования, проведенные в середине 20-го века, обнаружили присутствие D-аминокислот в тканях у высших животных и в клеточной стенке бактерий.

С 1980-х годов у млекопитающих, включая человека, были обнаружены некоторые D-энантиомеры. В частности, D-серин считается нейромодулятором подтипа N-метил-D-аспартата (NMDA) рецепторов глутамата в головном мозге, а D-аспарагин регулирует гормональную секрецию в различных эндокринных железах [3,4]. D-аланин также действует как агонист рецептора NMDA и локализуется в поджелудочной железе и передней доле гипофиза. Он также показывает четкие постнатальные и циркадные изменения [5]. Выше описанные D-энантиомеры считаются основными веществами для разработки лекарственных средств и диагностики различных заболеваний, поэтому необходимо иметь быстрый аналитический метод с высокой чувствительностью и селективностью [5]. Количество прочих D-энантиомеров у млекопитающих невелико, и они не были хорошо изучены из-за отсутствия соответствующих аналитических методов [6]. Усовершенствование этих методов дало возможность количественно определить D-энантиомеры в нейроэндокринных и эндокринных тканях млекопитающих [7,8]. Такие энантиомеры как D-серин, D-пролин, D-аспарагиновая кислота, D-аланин, D-глутаминовая кислота и D-метионин были обнаружены в центральной нервной системе (ЦНС), цереброспинальной жидкости, зубной эмали, дентине, хрусталике, сетчатке, аорте, кости. В опухолевых клетках были обнаружены энантиомеры глутаминовой кислоты, валина, лейцина, лизина. Большинство энантиомеров сопутствуют таким заболеваниям как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Боковой амиотрофической склероз (БАС), эпилепсия, заболевания почек, атеросклероз, катаракта, эластоз [9,10,11].

Наличие D-энантиомеров в белковых тканях человека обусловлено потреблением пищи и напитков. Около 80% D-энантиомеров поглощаются в кишечнике и метаболизируются в печени и почках под действием фермента аминокислоты оксидазы. Низкая активность этого фермента может привести к накоплению данных соединений в организме, которые встраиваются в структуру клетки и изменяют ее [11]. А также присутствие D-энантиомеров в пищевых продуктах снижает усвояемость белка и биодоступность незаменимых аминокислот. D-энантиомеры могут являться основным фактором токсичности пищевых продуктов [12]. Скорость всасывания L-аминокислот в кишечнике выше, чем скорость всасывания D-энантиомеров [13].

Некоторые работы ученых описывают наличие энантиомеров в различных пищевых продуктах. Так во фруктах и овощах концентрации энантиомеров относительно низкие и не превышают 3,4% (фрукты) и 0,7% (овощи) от содержания L-формы. В клементине D-серин — 1,7%, D-глутаминовой кислоты — 1,3% от содержания L-формы. D-аспараги-

новая кислота была обнаружена в грейпфруте и винограде, а D-аланин в яблоках — 2,7% от содержания L-формы.

В промышленных фруктовых соках обнаружили D-аланин от 10% — 42% от содержания L-формы. Такие высокие концентрации свидетельствуют о бактериальном заражении продукта на начальном этапе приготовления. Так как после термообработки бактерии не выживают, таким образом, образовавшиеся энантиомеры можно обнаружить инструментальным способом.

Известно, что молоко, молочные продукты и продукты, подвергшиеся ферментативной обработке, содержат значительное количество D-энантиомеров. Это связано с метаболизмом используемых микроорганизмов [13].

D-энантиомеры могут образовываться в результате пастеризации клеточных стенок микроорганизмов в рубце. Ферментация молока микроорганизмами приводит к высокому содержанию энантиомеров. В йогурте было найдено до 68% D-аланина, 66% D-глутаминовой кислоты и 32% D-аспарагиновой кислоты от содержания L-формы [14].

Пастеризация не приводила к значительному увеличению содержания данных соединений, но при ультрапастеризации молока увеличивала содержание энантиомеров с 2% — 4% до 4% — 6% от содержания L-формы. Использование молочнокислых бактерий и дрожжей привело к образованию несвязанного D-аланина до 38% и 34% от содержания L-формы несвязанного D-гуламиновой кислоты в тесте. Обжаренный кофе содержал 9% и 41% D-фенилаланина, D-аспарагиновой кислоты и D-глутаминовой кислоты от содержания L-формы, тогда как зеленые кофейные бобы содержали <0,2% энантиомеров от содержания L-формы. Квашеная капуста содержала до 25 раз большее количество энантиомеров (аланина, аспарагиновой кислот, глутаминовой кислоты, глицина, лейцина и лизина) по сравнению со свежей белокочанной капустой [14].

Из выше сказанного энантиомеры можно считать маркерными веществами для оценки возраста, изучения качества при хранении [15], оценки фальсификации [16] и контаминации [17,18], оценки процессов ферментации и изучение связи между компонентами пищи и здоровьем [19,20], а также при выявлении различных патологий.

При воздействии определенных условий обработки на пищевые белки происходит два основных химических изменения: рацемизация всех L-аминокислот до D-энантиомеров и одновременное образование сшитых аминокислот, например лизиноаланин. Рацемизация L-аминокислот возможна в условиях высоких температур и щелочного pH. Данный процесс наблюдался у восьми аминокислот в жареном казеине и бычьем сывороточном альбумине [21,22]. Кроме того, как отмечалось ранее в статье D-энантиомеры синтезируются микроорганизмами из L-изомеров, под воздействием ферментов, аминокислотных оксидаз, трансаминаз и рацемаз.

Белки, содержащие D-энантиомеры аминокислот, так же гидролизуются по пептидным связям, как и белки с L-аминокислотами, однако скорость гидролиза ниже, чем у соответствующих нативных белков [23].

Так как у млекопитающих преобразование оксидазами преобладает над коэффициентами конверсии рацематов или эпимеразы. Таким образом, у некоторых видов скорость использования D-энантиомеров в качестве источника L-изомера ограничена активностью оксидазы, что приводит к накоплению D-энантиомеров в организме [15].

Мастерс и Фридман в 1980 году вывели константу степени рацемизации $v\%$ для каждой аминокислоты (отношение D/L) в течение определенного времени, данные представлены в Таблице 1.

Таблица 1

Степень рацемизации аминокислот

| Аминокислота | Казеин | Лактальбу-мин | Пшеничная клейковина | Зейн белок | Рыба | Соя | BCA | Гемоглобин |
|-----------------------|--------|---------------|----------------------|------------|------|------|------|------------|
| Аланин | 15,2 | 14,4 | 18,6 | 22,2 | 19,3 | 15,8 | 22,1 | 17,1 |
| Вали | 2,6 | 2,7 | 4,0 | 4,9 | 3,1 | 2,5 | 3,5 | 4,0 |
| Лейцин | 7,4 | 5,0 | 7,2 | 7,8 | 6,8 | 6,3 | 8,2 | 6,6 |
| Изолейцин | 3,3 | 3,1 | 4,0 | 5,5 | 3,6 | 3,9 | 5,7 | 5,0 |
| Цистеин | | 32,1 | 32,0 | 43,7 | 22,8 | 21,0 | 23,0 | 30,0 |
| Метионин | 24,7 | 32,3 | 33,1 | 29,8 | 29,2 | 24,3 | 30,0 | 26,2 |
| Фенилаланин | 24,4 | 24,3 | 24,4 | 32,4 | 28,0 | 25,5 | 28,1 | 30,0 |
| Лизин | 8,1 | 7,2 | 9,4 | 8,0 | 11,5 | 11,3 | 13,3 | 9,9 |
| Аспарагиновая кислота | 29,2 | 22,6 | 25,6 | 41,6 | 25,0 | 30,8 | 27,0 | 18,9 |
| Глутаминовая кислота | 19,7 | 19,5 | 32,3 | 35,0 | 18,9 | 21,1 | 18,4 | 19,8 |
| Серин | 41 | 47,1 | 42,2 | 44,0 | 42,1 | 44,2 | 43,0 | 44,5 |
| Триптофан | 29,3 | 29,1 | 30,0 | 36,3 | 32,8 | 27,8 | 28,3 | 31,2 |
| Тирозин | 15,0 | 18,9 | 19,5 | 35,5 | 16,3 | 13,7 | 15,3 | 22,6 |

Оптические изменения аминокислот ухудшают питательные качества и безопасность пищевых продуктов за счет образования неметаболизируемых и биологически непригодных для использования их форм. Связанные D-D, D-L и L-D пептидные связи, частично или полностью недоступны для протеолитических ферментов, а так же образуются антагонистические и токсичные соединения. Кроме того, эти измененные белки конкурируют с белками, которые не имеют в своей структуре рацемизированных аминокислот, за активный центр пищеварительных протеиназ в кишечнике и, таким образом, делают нерацемизированные белки менее доступными для усвоения. Однако пока неизвестно, могут ли олигопептиды, содержащие D-энантиомеры, изменять микробную флору пищеварительного тракта [24]. Определение степени рацемизации аминокислот в белках долгое время было затруднительно из-за отсутствия подходящих аналитических методов для измерения образовавшихся специфических D-энантиомеров. В многочисленных исследованиях предпринимались попытки оптимизировать разделение дериватизированных аминокислот на различных хиральных колонках или с использованием хиральных агентов с последующим анализом с помощью ГХ, ГХ/МС и ВЭЖХ [25,26,27,28].

Поскольку D-энантиомеры образуются во время обработки пищевых продуктов, а также происходят из микробных источников, воды, почвы и других сред то они становятся частью нашего рациона (Таблица 2), существует потребность в оценке факторов, влияющих на их образование в пище, безопасность и роль в антимикробных пептидах, компонентах бактериальной клеточной стенки (пептидогликаны) и других функциональных и структурных биомолекулах.

Включение пробиотических бактерий в пищевые продукты увеличилось за последние десятилетия из-за благотворного воздействия, которое эти микроорганизмы оказывают на микрофлору кишечника. К числу наиболее часто используемых пробиотических бактерий в молочных продуктах относятся виды рода *Bifidobacterium*. Бифидобактерии ведут себя иначе по сравнению с обычными молочнокислыми бактериями, которые используются в ферментированных молочных продуктах (например, йогурте), поскольку они требуют длительного времени брожения, анаэробных условий, низкого окислительно-восстановительного потенциала и демонстрируют более слабый рост и выработку кислоты. Все молочнокислые бактерии содержат в своих клеточных стенках D-аланин, D-глутаминовую и D-аспарагиновую кислоты. В своей обзорной статье Шмидт и Мартин обобщили методы, используемые для определения белка микробного происхождения, и продемонстрировали потенциал использования D-аспарагиновой и D-глутаминовой кислот в качестве маркеров белков микробного происхождения [29].

Цель данной работы — провести исследования молока и кисломолочной продукции на содержание оптических изомеров аминокислот и определить степень рацемизации аминокислот в условиях разной обработки продукции. Полученные данные позволят провести анализ по изменению оптической структуры аминокислот и способствующих этому факторов.

2. Материалы и методы

2.1 Материалы

Для эксперимента было использовано сырое коровье молоко с фермы, по 3 пакета (1*10⁻⁶ м³ каждый) ультрапастеризованного молока и кефира различных производителей в сети розничной торговли.

- сырое коровье молоко 3,4% жирности — 1 образец;
- молоко ультрапастеризованное 3,2% жирности — 2 образец;
- молоко ультрапастеризованное 3,2% жирности — 3 образец;
- молоко ультрапастеризованное 3,2% жирности — 4 образец;
- кефир на бактериальной закваске 3,2% — 5 образец;

Таблица 2

Продукты, содержащие D-аминокислоты

| спиртные напитки | Пиво, вина (белые, красные), саке, уксусы, бактериальные закваски |
|--|--|
| Выпечка | Хлеб (свежий, поджаренный), сухарики, тесто, пшеничная мука |
| Бобовые продукты (бобовые) | Черная фасоль (ферментированная), соевая мука (экструдированная), соя детская смесь, соевый белок (текстурированный), соевые соусы и пасты, соевые бобы (ферментированные, мисо) какао-порошок |
| Кофе, сливки (казеинат натрия), зеленые, растворимые, жареные кукурузная мука тако и лепешки | |
| Молочные продукты | Сыры: выдержанный (созревший), Чеддер, свежий, запеченный, итальянский (моцарелла, пармезан), швейцарский (эмменталер), молоко (коровы, коровы с маститом, козье, овцы, пастеризованное, порошковое, сырое), кисломолочные продукты (кефир, йогурт, простокваша), сметана, сыворотка, детские смеси, бекон (имитация), пахта, сливки (имитация), соусы (бекон и чеддер). |
| Фрукты и овощи | Яблоки, морковь, капуста (белая, зеленая, маринованная, красная), чеснок, грейпфруты, виноград, лимоны, апельсины, помидоры фруктовые и овощные соки абрикос, свекла, ежевика, капуста (маринованная), морковь, сельдерей, вишня, клюква, смородина, нектарин, апельсин, персик, груша, малина, квашеная капуста, томат (паста, пюре, кетчуп), клубника |
| Яйца, рыбное блюдо, пищевые красители | |

- кефир на бактериальной закваске 3,2% — 6 образец;
- кефир на бактериальной закваске 3,2% — 7 образец.

2.2 Метод

Определение D-энантиомеров в пищевых продуктах проводили на системе ВЭЖХ с дидно-матричным детектором и автоматизированным пробоотборником.

Условия градиентного элюирования для определения энантиомеров представлены в Таблице 3.

Таблица 3

Условия градиентного элюирования

| Время, мин | CH ₃ OH, % | 0,01 М Na ₂ HO ₄ (рН 6.0), % |
|-----------------|-----------------------|--|
| 0–0,5 | 2 | 98 |
| 70 | 40 | 60 |
| 75 | 100 | 0 |
| 77 | 100 | 0 |
| 80 | 2 | 98 |
| 83 | 2 | 98 |
| Скорость потока | 0,5 мл/мин | |

2.3 Реагенты и растворители

В качестве реагентов использовали: CH₃OH для ВЭЖХ, производства Panreac (Франция), хиральные агенты N-ацетил-L-цистеин (НАК) (Sigma), ортофталевый альдегид (≥ 99,9%) (Sigma), гидрофосфат натрия (≥ 99,9%) (Sigma), соляную кислоту (≥ 37%), пепсин из слизистой оболочки желудка свиньи, (Sigma) (Активность, ед./мг белка 600–1,800) деионизованную воду, полученную на системе MilliQDirect 8 (Франция).

При проведении анализа использовали хроматографическую колонку длиной 150 мм и диаметром 2,1 мм с обращенной фазой C18, размером частиц 3,5 мкм, а так же ВЭЖХ систему Agilent 1260 Infinity LC со диодноматричным детектором.

Для твердофазной очистки использовали картриджи, заполненные обращено-фазовым сорбентом C18, 500 мг, объемом картриджа 6 мл, размер частиц 30 мкм.

2.4 Подготовка проб к анализу

100 мг гомогенизированной пробы количественно перенесли в центрифужную пробирку и добавили буферный раствор Трис-HCl до массовой концентрации 2 мг/см³, Расщепление ферментным препаратом (пепсином) осуществляли с использованием соотношения фермента к субстрату 1:10 от массы пробы. Инкубировали 16 ч при 37 °С на водяной бане.

Для осаждения нерастворимых продуктов получившийся гидролизат центрифугировали в течение 5 мин при 15000 об/мин. Супернатант пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Далее очистку гидролизата проводили методом твердофазной экстракции (ТФЭ).

Патрон ТФЭ предварительно кондиционировали пропуская последовательно 2 см³ метилового спирта и 2 см³ дистиллированной воды. 0,4 см³ гидролизата пробы наносили на патрон. Экстракцию с патрона осуществляли в две стадии: последовательным элюированием 1 см³ метилового спирта и 1,5 см³ смеси ацетонитрила, собирая смывы. Затем элюент переносили в круглодонную колбу вместимостью 50 см³ и упаривали до сухого остатка при 60 °С. Сухой остаток перерастворяли в 1 см³ буфера с рН 2,2. Растворенный сухой остаток пропускали через шприцевой фильтр 0,45 мк в хроматографическую вialу для проведения анализа.

Для разделения аминокислот, можно использовать как ручную, так и автоматическую дериватизацию, хиральный агент должен прореагировать с аминокислотами в течении 30 секунд (Рисунок 1).

3. Результаты и обсуждение

Исследования проводились в двух выборках по три параллельных измерения в каждой. За окончательный результат принималось среднее арифметическое трех параллелей в первой выборке. Критерий Стьюдента двух выборок для каждого определяемого аналита в каждом образце не превышал табличное значение при n = 3 и доверительной вероятности p = 0,95, т. е. различия между выборками

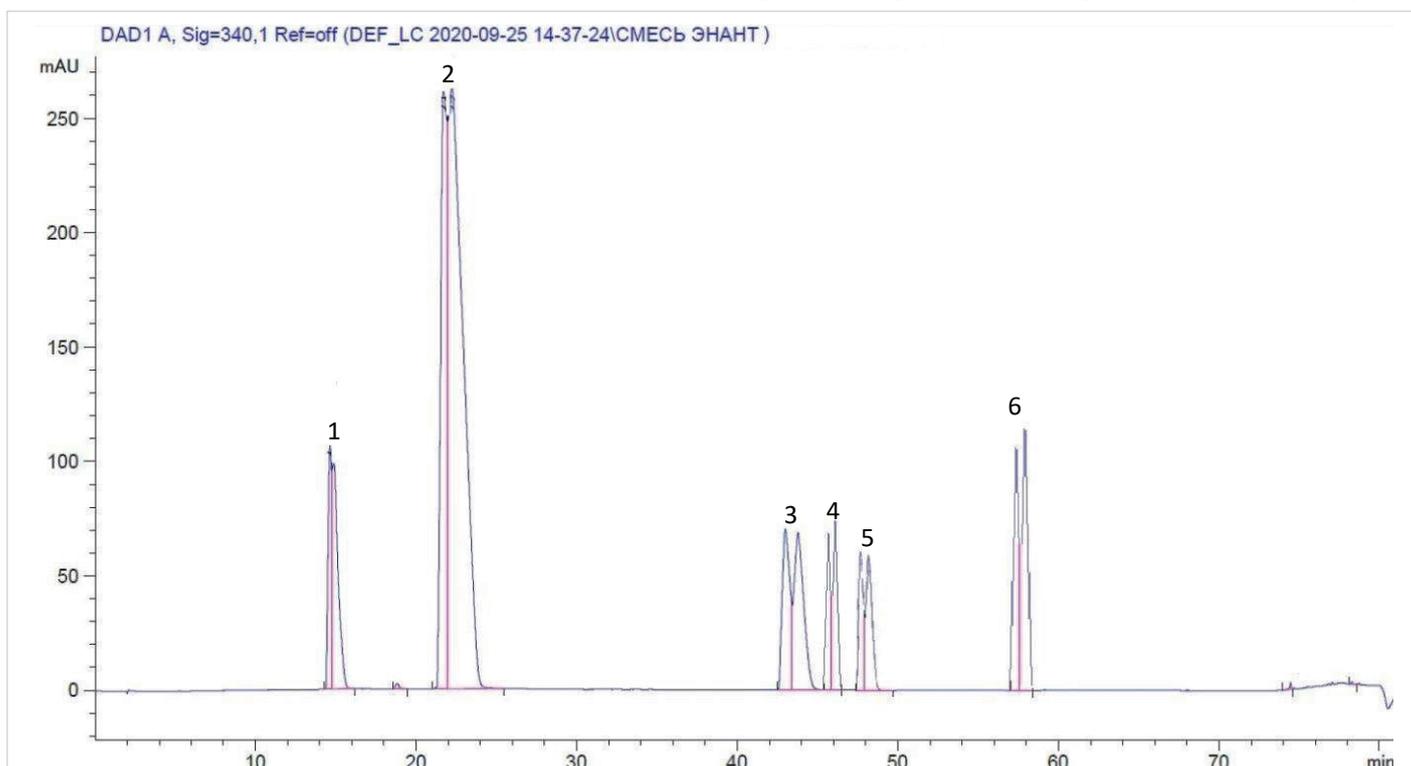


Рисунок 1. Хроматограмма смеси стандартов энантимеров: 1 – D-, L – аланин; 2 – D-, L – треонин; 3 – D-, L – метионин; 4 – D-, L – фенилаланин; 5 – D-, L – лейцин; 6 – D-, L – изолейцин

статистически не значимы. В выбранных объектах исследования так же провели количественное определение белка по ГОСТ 25179–2014. Результаты приведены в Таблицах 4 и 5.

Таблица 4

Содержание белка в образцах

| Наименование | 1 образец, % | 2 образец, % | 3 образец, % | 4 образец, % | 5 образец, % | 6 образец, % | 7 образец, % |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Белок | 11,9 ± 0,18 | 11,3 ± 0,18 | 11,2 ± 0,18 | 11,3 ± 0,18 | 11,4 ± 0,18 | 11,5 ± 0,18 | 11,5 ± 0,18 |

Таблица 5

Содержание D-энантиомеров в образцах (% г/100 г продукта)

| Наименование аминокислоты | 1 образец, % | 2 образец, % | 3 образец, % | 4 образец, % | 5 образец, % | 6 образец, % | 7 образец, % |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Аланин | 0,051 | 0,071 | 0,061 | 0,070 | 0,061 | 0,061 | 0,062 |
| Фенилаланин | 0,014 | 0,044 | 0,041 | 0,043 | 0,089 | 0,091 | 0,091 |
| Метионин | 0,012 | 0,066 | 0,063 | 0,056 | 0,090 | 0,089 | 0,090 |
| Треонин | 0,004 | 0,018 | 0,016 | 0,018 | 0,016 | 0,013 | 0,012 |
| Изолейцин | 0,011 | 0,014 | 0,014 | 0,015 | 0,050 | 0,051 | 0,051 |
| Лейцин | 0,011 | 0,019 | 0,019 | 0,019 | 0,033 | 0,035 | 0,035 |
| Всего | 0,103 | 0,232 | 0,214 | 0,221 | 0,339 | 0,320 | 0,341 |

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что наименьшее количество энантиомеров по сумме во образце сырого молока — № 1 (0,103%), относительно образцов молока (2, 3, 4) — 0,222% и кефира (5, 6, 7) — 0,333%.

Образец № 1 обладает наименьшим содержанием D-энантиомеров, так как сырое молоко не имеет внешнего бактериального заражения и не подвергнуто высокотемпературной обработке, однако по предоставленным результатам видно, что энантиомеры все же образовались в сыром молоке, данное явление возможно связано с процессами метаболизма растительной пищи у КРС. У КРС, как и у других жвачных животных, есть многоступенчатая система переваривания. На одном из этапов в рубце пища подвергается микробиологическому расщеплению, в этот момент происходит рацемизация аминокислот, которые дальше распределяются по организму. При разном кормлении в рубце формируются различные популяции микроорганизмов. А также в одной из работ, ученые доказали связь присутствия энантиомеров в сыром молоке при заболелании маститом. Поскольку D-аминокислоты часто являются продуктами бактериального метаболизма, а мастит — это воспаление вымени, вызванное бактериями [30]. Анализируя полученные данные из Таблицы 5, видно, что количество D-фенилаланина в образцах кефира на бактериальной закваске в 2 раза выше, чем в ультрапастеризованном молоке. В этих же образцах наибольшей рацемизацией подвергся и D-метионин, его содержание в кефире в 1,5 раза выше, чем в молоке. Количество D-изолейцина увеличилось в 3,6 раза, а D-лейцин в 1,8 раза.

Так в своей работе Кехагиас С. доказал образование энантиомеров в молоке при обработке бактерией *B. Longum*. D-аминокислоты присутствуют в клеточных стенках бактерий, и образуются из соответствующих L-энантиомеров под действием ферментов. Кехагиас проследил за ферментацией молока и ростом бактерий путем определения несвязанных D-аминокислот. В этом исследовании были количественно

определены несвязанные D-аспарагиновая и D-глутаминовая кислоты в молоке коров, овец и коз во время роста *B. Longum*. Результаты D-энантиомеров приведены в Таблице 6. По полученным результатам Кехагиаса можно наблюдать увеличение D-энантиомеров во время ферментации молочнокислыми бактериями [31].

Таблица 6

Несвязанные D-аспарагиновая и глутаминовая кислоты (мг/100 г) сухого обезжиренного молока коров, коз и овец во время ферментации *B. Longum*

| Инкубационный период, ч | Корова | | Коза | | Овца | |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| | D-аспарагиновая кислота | D-глутаминовая кислота | D-аспарагиновая кислота | D-глутаминовая кислота | D-аспарагиновая кислота | D-глутаминовая кислота |
| 0 | 0,77 ± 0,05 | 1,12 ± 0,06 | 0,35 ± 0,02 | 0,86 ± 0,07 | 0,32 ± 0,02 | 0,73 ± 0,05 |
| 24 | 2,28 ± 0,15 | 2,42 ± 0,10 | 0,86 ± 0,05 | 1,68 ± 0,11 | 0,78 ± 0,06 | 1,79 ± 0,12 |

Разница в результатах между тремя образцами молока сводится в диапазоне погрешности методики, что может свидетельствовать о стабильности рацемизации в процессе технологического производства молочной продукции. Аналогичный вывод можно сделать и для кисломолочной продукции анализируя три образца кефира на бактериальной закваске. Так же по изученным результатам зарубежных ученых наблюдаем тенденцию в образовании энантиомеров в несвязанном виде, которые выделили в качестве маркеров при молочнокислой ферментации в присутствии бактерии *B. Longum*

Так же провели исследование образцов на содержание L-аминокислот (Таблица 7).

Таблица 7

Содержание L-аминокислот в образцах (% г/100 г продукта)

| Наименование аминокислоты | Молоко ультрапастеризованное | Кефир на бактериальной закваске |
|---------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Аланин | 0,40 | 0,43 |
| Фенилаланин | 0,55 | 0,57 |
| Метионин | 0,29 | 0,28 |
| Треонин | 0,52 | 0,44 |
| Изолейцин | 0,69 | 0,64 |
| Лейцин | 1,12 | 1,11 |

Исходя из полученных результатов была рассчитана степень рацемизации каждой аминокислоты при тепловой обработке и кисломолочном брожении (Рисунок 2).



Рисунок 2. Диаграмма степени рацемизации аминокислот в условиях разной обработки

Исходя из рассчитанной степени рацемизации видно, что способ обработки почти не влияет на оптические изменения каждой индивидуальной аминокислоты, однако наибольшей рацемизацией при тепловой обработке и кислomолочном брожении подверглась аминокислота метионин в среднем на 21,64%, аланин на 16,24%, меньше всего оптические изменения претерпели лейцин — 1,7% и изолейцин — 2,16%.

Данные результаты доказывают, что образование D-энантиомеров связано с технологией производства, а именно ферментация молока микроорганизмами приводит к завышенному содержанию энантиомеров в продукте. Стоит отметить, что некоторые аминокислоты, такие как метионин, аланин и фенилаланин подверглись рацемизации сильнее чем треонин, изолейцин и лейцин, что подтверждают данные из Таблицы 1 и такое явление связано со строением каждой аминокислоты, хиральные изменения аминокислот та же в значительной степени зависят от силы пептидных связей.

4. Заключение

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: поскольку молоко и молочные продукты получают с использованием различных технологических обработок и сырье для пастеризованного молока и кефира так же получают различными способами, то энантиомеры будут

присутствовать и влиять в той или иной степени на качество и безопасность продукции. В большинстве молочных продуктов были обнаружены D-энантиомеры аминокислот, как в связанных с белком, так и не связанных, но вследствие отсутствия норм по предельно допустимым концентрация, невозможно оценить уровень опасности продукции.

Дальнейшие мониторинговые исследования будут направлены на сбор статистических данных по количественному содержанию D-энантиомеров аминокислот в различных видах пищевой продукции, так как известно, что пороговая токсическая величина у мышей после внутримышечного введения составляет 1000 мг/кг. Такое понимание позволит свести к минимуму неблагоприятные последствия обработки пищевых продуктов и максимизировать полезные, а также оценить риск здоровью человека. Полученные результаты показали необходимость более глубоких исследований в данном направлении для установления наиболее важных факторов процесса рацемизации аминокислот пищевых продуктов.

Для оценки степень рацемизации каждой аминокислоты планируется проанализировать аминокислотный состав и затем подвергнуть сырое молоко различным видам обработки, что позволит получить данные по изменению оптической структуры аминокислот и способствующих этому факторах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК/ REFERENCES

- Silva-Adaya, D., Garza-Lombó, C., Gonsebatt, M. E. (2021). Xenobiotic transport and metabolism in the human brain. *Neuro Toxicology*, 86, 125–138. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.08.004>
- Aung, M. T., Song, Y., Ferguson, K. K., Cantonwine, D. E., Zeng, L., McElrath, T. F. et al. (2020). Application of an analytical framework for multivariate mediation analysis of environmental data. *Nature Communications*, 11(1), Article 5624. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19335-2>
- Snyder, S. H., Kim, P. M. (2000). D-amino acids as putative neurotransmitters: Focus on D-serine. *Neurochemical Research*, 25(5), 553–560. <https://doi.org/10.1023/a:1007586314648>
- Furuchi, T., Homma, H. (2005). Free D-aspartate in mammals. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(9), 1566–1570. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1566>
- Bastings, J. J. A. J., van Eijk, H. M., Damink, S. W. O., Rensen, S. S. (2019). D-amino acids in health and disease: A focus on cancer. *Nutrients*, 11(9), Article 2205. <https://doi.org/10.3390/nu11092205>
- Hamase, K. (2007). Sensitive two-dimensional determination of small amounts of D-amino acids in mammals and the study on their functions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(4), 503–510. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.503>
- D'Aniello, G., Grieco, N., Di Filippo, M. A., Cappiello, F., Topo, E., D'Aniello, E., Ronsini, S. (2007). Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Human Reproduction*, 22(12), 3178–3183. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem328>
- Karakawa, S., Shimbo, K., Yamada, N., Mizukoshi, T., Miyano, H., Mita, M. et al. (2015). Simultaneous analysis of D-alanine, D-aspartic acid, and D-serine using chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to the rat plasma and tissues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.05.024>
- Visser, W. F., Verhoeven-Duif, N. M., Ophoff, R., Bakker, S., Klomp, L. W., Berger, R. et al. (2011). A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the quantification of d-amino acids in body fluids. *Journal of Chromatography A*, 1218(40), 7130–7136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.087>
- Ohide, H., Miyoshi, Y., Maruyama, R., Hamase, K., Konno, R. (2011). D-amino acid metabolism in mammals: Biosynthesis, degradation and analytical aspects of the metabolic study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(29), 3162–3168. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.06.028>
- Xing, Y., Li, X., Guo, X., Cui, Y. (2016). Simultaneous determination of 18 d-amino acids in rat plasma by an ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: Application to explore the potential relationship between alzheimer's disease and d-amino acid level alterations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(1), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9086-3>
- Man, E. H., Bada, J. L. (1987). Dietary D-amino acids. *Annual Review of Nutrition*, 7, 209–225. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.07.070187.001233>
- Finch, L. R., Hird, F. J. R. (1960). The uptake of amino acids by isolated segments of rat intestine II. A survey of affinity for uptake from rates of uptake and competition for uptake. *BBA — Biochimica Et Biophysica Acta*, 43(C), 278–287. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)90438-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(60)90438-8)
- Cartus, A. T. (2012). D-amino acids and cross-linked amino acids as food contaminants. Chapter in a book: Chemical contaminants and residues in food. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857095794.2.286>
- Friedman, M., Levin, C. E. (2012). Nutritional and medicinal aspects of D-amino acids. *Amino Acids*, 42(5), 1553–1582. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0915-1>
- D'Orazio, G., Cifuentes, A., Fanali, S. (2008). Chiral nano-liquid chromatography-mass spectrometry applied to amino acids analysis for orange juice profiling. *Food Chemistry*, 108(3), 1114–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.062>
- Guimont, Ch. (2002). Change of free amino acids in M₁₇ medium after growth of *Streptococcus thermophilus* and identification of a glutamine transport ATP-binding protein. *International Dairy Journal*, 12(9), 729–736. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00068-7)
- Mangia, N. P., Murgia, M. A., Garau, G., Sanna, M. G., Deiana, P. (2008). Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and fiore sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology*, 25(2), 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.09.009>
- Rocco, A., Aturki, Z., Fanali, S. (2013). Chiral separations in food analysis. *TrAC — Trends in Analytical Chemistry*, 52, 206–225. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.022>
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F. et al. (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113(9 SUPPL.2), 71–88. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)00995-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(01)00995-0)
- Inoue, Y., Sugahara, N., Wada, T. (2001). Vital role of entropy in photochirogenesis. *Pure and Applied Chemistry*, 73(3), 475–480. <https://doi.org/10.1351/pac200173030475>
- Kojo, S., Uchino, H., Yoshimura, M., Tanaka, K. (2004). Racemic D, L-asparagine causes enantiomeric excess of other coexisting racemic D, L-amino acids during recrystallization: A hypothesis accounting for the origin of L-amino acids in the biosphere. *Chemical Communications*, 19, 2146–2147. <https://doi.org/10.1039/b409941a>
- Konno, R., Brückner, H., D'Aniello, A., Fisher, G.H., Fujii, N., Homma, H. (2009). D-Amino Acids: Practical Methods and Protocols. D-Amino Acids in Peptides and Proteins. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA. 2009.
- Zawirska-Wojtasiak, R. (2006). Chirality and the nature of food authenticity of aroma. *Aliment Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 5(1), 21–36.
- Soyez, D., Toullec, J. -Y., Montagné, N., Ollivaux, C. (2011). Experimental strategies for the analysis of d-amino acid containing peptides in

crustaceans: A review. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(29), 3102–3107. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.032>

26. Müller, C., Fonseca, J. R., Rock, T. M., Krauss-Etschmann, S., Schmitt-Kopplin, P. (2014). Enantioseparation and selective detection of D-amino acids by ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry in analysis of complex biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1324, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.026>

27. Sakai-Kato, K., Kinouchi, T., Fujii, N., Imai, K., Utsunomiya-Tate, N. (2009). Screening system for D-asp-containing proteins using D-aspartyl endopeptidase and two-dimensional gel electrophoresis. *Amino Acids*, 36(1), 125–129. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0040-y>

28. Sadakane, Y., Yamazaki, T., Nakagomi, K., Akizawa, T., Fujii, N., Tanimura, T. et al. (2003). Quantification of the isomerization of asp residue in recombinant human α A-crystallin by reversed-phase HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(6), 1825–1833. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(02\)00525-3](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00525-3)

29. Csapo, J., Csapo-Kiss, Zs., Schmidt, J., Martin, T. G. (2001). Quantitative determination of protein of bacterial origin. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 20(1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/s0167-2940\(01\)90105-0](https://doi.org/10.1016/s0167-2940(01)90105-0)

30. Csapó, J., Csapó-Kiss, Z., Stefler, J., Martin, T. G., Némethy, S. (1995). Influence of mastitis on D-amino acid content of milk. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2375–2381. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76865-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76865-5)

31. Kehagias, C., Csapó, J., Konteles, S., Kolokitha, E., Koulouris, S., Csapó-Kiss, Z. (2008). Support of growth and formation of d-amino acids by bifidobacterium longum in cows', ewes', goats' milk and modified whey powder products. *International Dairy Journal*, 18(4), 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.014>

| СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | AUTHOR INFORMATION |
|---|--|
| Принадлежность к организации | Affiliation |
| <p>Князева Александра Сергеевна — младший научный сотрудник, лаборатория «Научно-методических работ, биологических и аналитических исследований», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-79-61 E-mail: a.knyazeva@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0038-9744 * автор для контактов</p> | <p>Aleksandra S. Knyazeva — junior researcher, Laboratory “Scientific and methodical work, biological and analytical research”, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences. 26, Talalikhina, 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-79-61 E-mail: a.knyazeva@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0038-9744 * corresponding author</p> |
| <p>Утьянов Дмитрий Александрович — кандидат технических наук, научный сотрудник, лаборатория «Научно-методических работ, биологических и аналитических исследований», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 +7-495-676-79-61 E-mail: d.utyaynov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7693-3032</p> | <p>Dmitry A. Utyaynov — candidate of technical sciences, research scientist, Laboratory «Scientific and methodical work, biological and analytical research», V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences. 26, Talalikhina, 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-79-61 E-mail: d.utyaynov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7693-3032</p> |
| <p>Куликовский Андрей Владимирович — кандидат технических наук, заведующий лабораторией «Научно-методических работ, биологических и аналитических исследований», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +495-676-60-11 E-mail: a.kulikovskii@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9140-5390</p> | <p>Andrey V. Kulikovskii — candidate of technical sciences, a head of laboratory «Scientific and methodical work, biological and analytical research», V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences. 26, Talalikhina, 109316, Moscow, Russia Tel.: +495-676-60-11 E-mail: a.kulikovskii@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9140-5390</p> |
| <p>Курзова Анастасия — младший научный сотрудник, лаборатория «Научно-методических работ, биологических и аналитических исследований», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-79-61 E-mail: a.kurzova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5679-3984</p> | <p>Anastasiya A. Kurzova — junior researcher, Laboratory “Scientific and methodical work, biological and analytical research”, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences. 26, Talalikhina, 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-79-61 E-mail: a.kurzova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5679-3984</p> |
| Критерии авторства | Contribution |
| <p>Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат</p> | <p>Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism</p> |
| Конфликт интересов | Conflict of interest |
| <p>Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов</p> | <p>The authors declare no conflict of interest</p> |