На правах рукописи

АХРЕМКО АНАСТАСИЯ ГЕННАДЬЕВНА

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОТЕОМНОГО МЕТОДА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА МЯСА И МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Специальность 05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» Российской академии наук

Научный руководитель: Кандидат технических наук, **Федулова Лилия Вячеславовна**

Официальные оппоненты: **Абрамова Любовь Сергеевна** доктор технических наук, профессор, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО»), Департамент по вопросам качества пищевой рыбной продукции Департамента мониторинга среды обитания, водных биоресурсов и продуктов их переработки, заместитель руководителя

Кручинин Александр Геннадьевич кандидат технических наук, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»), лаборатория молочных консервов, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молочных консервов

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение высшего образования «Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции», г. Волгоград.

Защита диссертации состоится «___» _____2021 г. в _____ на заседании ученого совета Д 006.021.02 при ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по адресу: г. Москва, ул. Талалихина, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН и на сайте www.vniimp.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат технических наук, старший научный сотрудник Захаров А.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Мясо и мясные продукты всегда будут играть важную роль в рационе человека как источник полноценного белка. Существует большое разнообразие продуктов переработки мяса, ассортимент которых регулярно пополняется. В зависимости от технологии переработки мясные белки подвергаются различным модификациям, которые оказывают влияние на качество мяса, срок годности, пищевую ценность и, как следствие, воздействуют на здоровье человека (Gómez et al., 2020). На все это также могут влиять следующие факторы: генетика, окружающая среда, условия содержания животных и дальнейшая переработка. Поэтому вызывают интерес молекулярные механизмы, лежащие в основе модификации белков. Важно отметить, что генетическая информация остается статической в течение жизни животного, в то время как белковый состав динамичен и меняется в зависимости от факторов, влияющих на синтез или деградацию белка (Baehr et al, 2017). Исследование протеома дает возможность не только изучить молекулярные механизмы на более глубоком уровне, происходящие в тканях, но и спрогнозировать интересующие свойства мясного сырья и продуктов (Purslow et al, 2021).

Сегодня стремительно развивающиеся методы протеомики применяют для разделения белков, в основном, в двух направлениях: хроматографические или электрофоретические методы с последующей идентификацией точечных маркеров при помощи масс-спектрометрических детекторов (Suman et al., 2014; Л.В. Федулова, 2018). В связи с этим особо актуальным является подбор условий протеомного анализа для расширения возможностей и более детального изучения мышечной ткани продуктивных животных, в том числе в составе мясных продуктов.

Степень разработанности темы. Научными и прикладными исследованиями в области протеомики сельскохозяйственных животных, включая изучение автолитических процессов, протеолиза, окислительных реакций, стабильности цвета,

вкуса и запаха мяса, занимались такие ученые, как Л.И. Ковалев, С.С. Шишкин, И.М. Чернуха, E. Bendixen, A.M. de Almeida, D. Eckersall, L. Mora, F. Toldrá, I. Miller, M.A. Sentandreu, S.P. Suman, M. Montowska, E. Pospiech и др.

Отдельные этапы работы выполнены в рамках:

– гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-316-90056 «Выявление и изучение основных вариаций аберрантных протеоформ мышечной ткани свиней» (2019 – 2021 г.).

– гранта Российского научного фонда № 19-76-10034 «Направленная *in vivo* модификация протеостаза продуктивных животных для создания инновационной технологии дието-терапевтического мясного продукта» (2019 – 2021 г.).

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлось разработка оптимальных условий пробоподготовки и проведения электрофоретического анализа для качественного определения белкового состава мяса и мясных продуктов, а также для выявления основных групп, модифицируемых мышечных белков.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. На основе анализа литературных данных изучить варианты проведения двумерного электрофореза и подобрать оптимальные условия для повышения разрешающей способности метода анализа белков мышечной ткани.

2. Провести протеомные исследования мышечной ткани свиней различной локализации в разные периоды онтогенеза; посредством биоинформационного анализа изучить полученные протеомные карты и выявить белки, участвующие в процессах роста и развития свиней и формирующие качественные показатели мясного сырья и продуктов.

3. Определить основные группы модифицируемых мышечных белков модельных фаршевых систем после различного температурного воздействия.

4. Апробировать условия протеомного исследования белковой составляющей мясных продуктов на примере кусковых мясных консервов из свинины и говядины, получить протеомные карты составных частей консервов.

5. Разработать и утвердить методические рекомендации по выявлению белков и интерпретации результатов одно- и двумерных электрофореграмм и стандарт организации на методику подготовки проб для проведения 2D-электрофореза для кусковых консервов.

Научная новизна исследования.

- Подобраны оптимальные условия проведения изоэлектрофокусирования для выявления белков мышечной ткани.
- Получены протеомные карты мышц различной локализации поросят и половозрелых свиней. Выявлены вариации основных групп мышечных белков, участвующих в процессах роста и развития свиней и формирующие качественные показатели мясного сырья и продуктов.
- Выявлены и описаны группы мышечных белков модельных фаршевых систем, модифицируемых после различных температурных воздействий.

Теоретическая и практическая значимость.

- Усовершенствован метод протеомного анализа, который может быть использован как полуколичественный скрининговый метод определения белкового состава мяса и мясных продуктов.
- Обосновано применение анодного варианта изоэлектрофокусирования, когда изменено направления тока, и дополнительная инкубация в буфере с йодацетамидом для получения более четкого разделения белковых фракций.
- Адаптирован процесс пробоподготовки для повышения разрешающей способности электрофоретического анализа кусковых мясных консервов и разработан СТО 00419779-000-2021 Консервы кусковые мясные и мясосодержащие. Методика подготовки проб для проведения 2D-электрофореза.

- На основе проведенных исследований разработаны и утверждены методические рекомендации по анализу результатов одно- и двумерных электрофореграмм, которые используются в подразделениях ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, а также при подготовки дипломных работ бакалавров и магистров ФГБОУ ВО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», ФГБОУ ВО «МГАВМиБ им. К.И. Скрябина», «РГАУ – МСХА м. К. А. Тимирязева», ФГБОУ ВО «МГУПП».

Методология и методы исследований.

Использованы протеомные методы исследования, включающие электрофоретическое разделение, компьютерную денситометрию, масс-спектрометрическую идентификацию, а также методы биоинформационного анализа.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Обоснованы параметры разделения белковых фракций мышечных белков методом двумерного электрофореза.
- Выявлены различия протеомов мышечной ткани разной локализации поросят и половозрелых свиней на основании сравнительного анализа белков; показано, что в процессе роста и развития свиней в их мышечной ткани снижается концентрация белков, но при этом, происходит увеличение их количества, а изменениям подвержены, преимущественно, белки актомиозинового комплекса.
- При оценке качественного состава фаршевых систем из свинины и говядины обоснован выбор бета-енолазы и изоформ миозиновых легких цепей как кандидатных биомаркеров видовой принадлежности; порог чувствительности метода – 0,1 % сырья, вносимого в фаршевую систему.
- После термического воздействия (замораживание и варка) выявлена деградация миозиновых легких цепей 2 и триозофосфатизомеразы 1.
- Показана наибольшая информативность результатов при раздельном (мясо и бульон) изучении протеомных карт мясных кусковых консервов.

Достоверность полученных результатов подтверждается корректным использованием теоретических и экспериментальных средств и методик проведения исследований, обоснованием и статистической обработкой результатов.

Личный вклад автора. Все изложенные в диссертации результаты получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Постановка задач, интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций. Диссертантом была проведена разработка схемы исследования (92 %), осуществлен обзор источников литературы, лично выполнены лабораторные исследования, а также обработка полученных результатов (99 %). Соискатель подобрал условия и параметры проведения электрофоретических исследований белковых соединений мышечной ткани и мясных продуктов (96 %), непосредственно участвовал в формулировании выводов и научных положений, написании статей (83 %) и тезисов (95 %), подготовил текст и оформил иллюстративный материал для диссертации (96 %).

Апробация работы. Результаты исследования доложены на: XIV Scientific conference with international participation «Food safety and control» (Пьештьяны, 2017); Международной конференции молодых ученых «Молодежь в науке 2017» (Минск, 2018); Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018); 48th Lenfeld's and Hökl's Days 2018 «Food Hygiene and Technology» (Брно, 2018); XIII Annual Congress of the European Proteomics Association: From genes via proteine and their interaction to function (Потсдам, 2019); IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, 2019); XIV Международном биотехнологическом форуме «РосБиоТех-2020» (Москва, 2020); XII Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств» (Могилев, 2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 25 печатных работ, из них 7 публикаций в изданиях, индексируемых международными базами данных WOS и

Scopus, 8 публикаций в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также 1 Методические рекомендации.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы из 143 наименований и 7 приложений. Основное содержание работы изложено на 63 страницах, включает 3 таблицы и 17 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ. Обоснована актуальность, научная новизна, практическая значимость работы и положения, выносимые на защиту.

ГЛАВА 1. ОБЗОР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ. Представлен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы, проанализированы данные о протеомных исследованиях пищевых продуктов, рассмотрены протеомные методы анализа мясного сырья и продуктов.

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Определены объекты исследования, представлены методологические подходы к проведению исследований по схеме (рисунок 1).

Объектами исследования являлись: образцы мышечной ткани: *l. dorsi, b. femoris, m. brachiocephalicus* молодняка (60 сут.) и половозрелых (180 сут.) свиней породы вьетнамская вислобрюхая (**А**); модельные фаршевые системы: с содержанием свинина : говядина в соотношении 10,0 : 90,0 %; 1,0 : 99,0 %; 0,1 : 99,9 %; 0,01 : 99,99% (**Б**); модельные фаршевые системы из свинины: свежие, замороженные (минус 40 °С), термообработанные (варка до достижения 70–72 °С в центре образца) (**В**); стерилизованные кусковые мясные консервы высшего сорта по ГОСТ 32125-2013: из говядины (ООО «ПК МАМИР», состав: говядина, жир говяжий, лук репчатый, соль поваренная пищевая, лист лавровый) (**Г**); из свинины (ООО «Русская Ресурсная Компания – Сибирь», состав: свинина, лук репчатый, соль поваренная пищевая, лист лавровый, перец черный) (**Д**).

В работе использовали стандартные и общепринятые химические, физико-химические и биохимические методы исследований, биоинформационный анализ результатов. Преимущественно, работа основывалась на протеомных методах.

Протеомные исследования: одномерный электрофорез (**1**) по методу Лэммли в 12,5 % ПААГ в присутствии SDS в камере (Helicon, Россия) с использованием стандарта (Thermo, Латвия); двумерный электрофорез (**2**) по О'Фарреллу с использованием камеры (Bio-Rad, США) с помощью изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в стеклянных трубках в первом направлении, электрофорезом в пластине ПААГ во втором направлении и окрашиванием кумасси G-250 (PanReac, Испания); компьютерную денситометрию **(3)** двумерных электрофореграмм во влажном состоянии, полных/отдельных фрагментов осуществляли с помощью сканера Bio-5000 plus (Serva, Германия), разрешение 300 ppi, анализ изображений с помощью ПО ImageMaster ™ 2D Platinum на базе Melanie 8.0 (GE Healthcare and Genebio, Швейцария); биоинформационный анализ **(4)** – белковые пятна интерпретировали в соответствии с БД Swiss-Prot, БД протеомики мышечных органов (Kovaleva et al., 2013); масс-спектрометрический анализ **(5)** – с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека»: полученные трипсинолизом пептиды анализировали с использованием ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, США) соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HFX (Thermo Scientific, США) в режиме положительной ионизации с использование источника NESI (Thermo Scientific, США). Идентификацию белков проводили при помощи ПО MaxQuant v.1.6.3.4, поисковый алгоритм Andromeda с использованием БД Uniprot с ограничением по видовой принадлежности организма **(6)**.

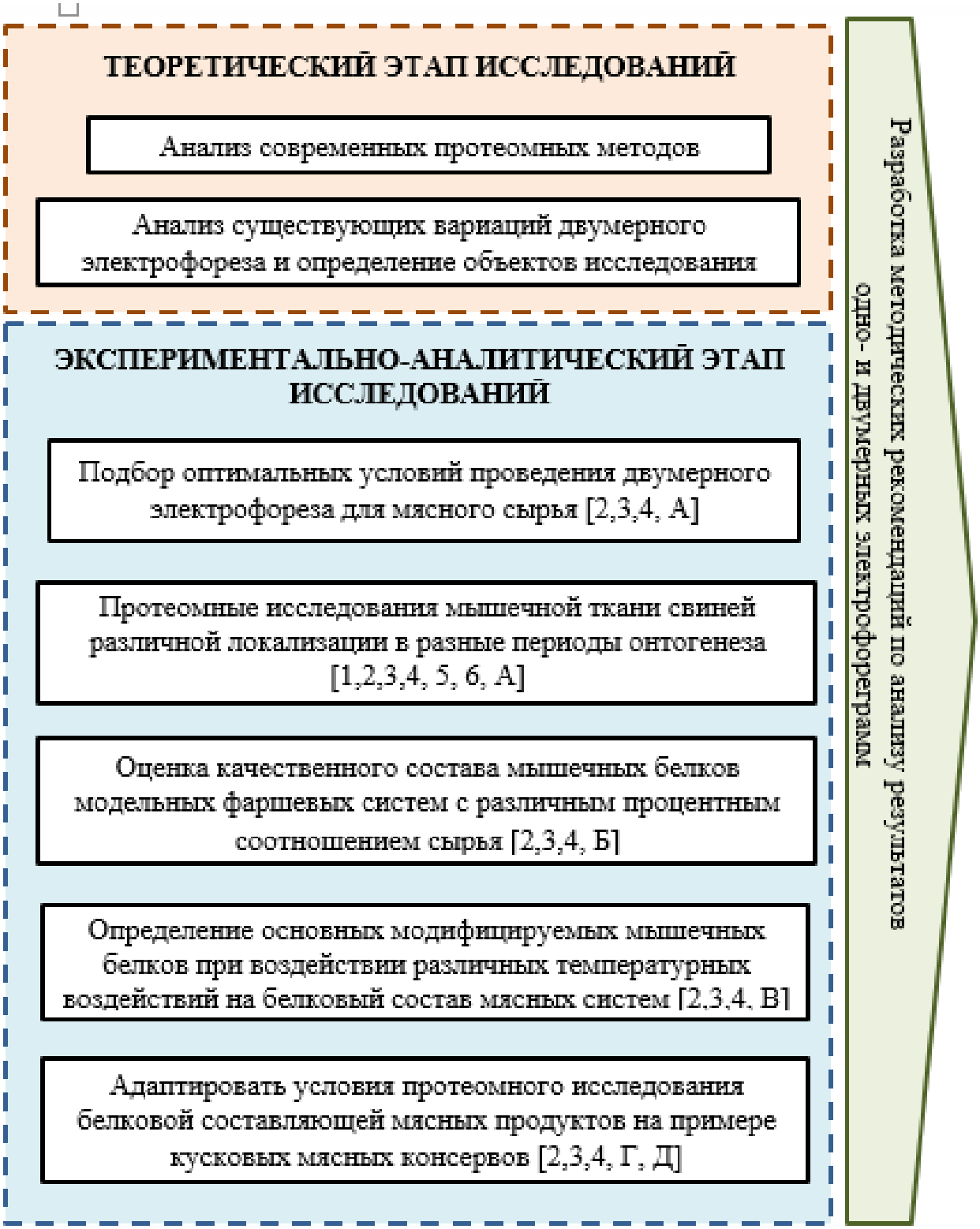

Рисунок 1 – Схема диссертационного исследования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. Для определения оптимального варианта анализа мясного протеома рассмотрены четыре вариации проведения 2-ДЭ на примере мышц *l. dorsi* свиньи (рисунок 2). При катодном варианте ИЭФ наблюдалось хорошее разделение белков с pI от 5 до 6,5 (рисунок 2 A и B), предположительно β-цепь тропомиозина, α-3-цепь тропомиозина, легкая цепь миозина-3 и легкая цепь миозина-1/3. В случае анодного варианта ИЭФ (рисунок 2 C и D) процесс проходит быстрее и выявляется в два раза больше белковых пятен, в том числе основных структурных мышечных белков, таких как глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, группа тропонинов, гидроксиацил-3-коэнзим А дегидрогеназа, бета-енолаза и др.

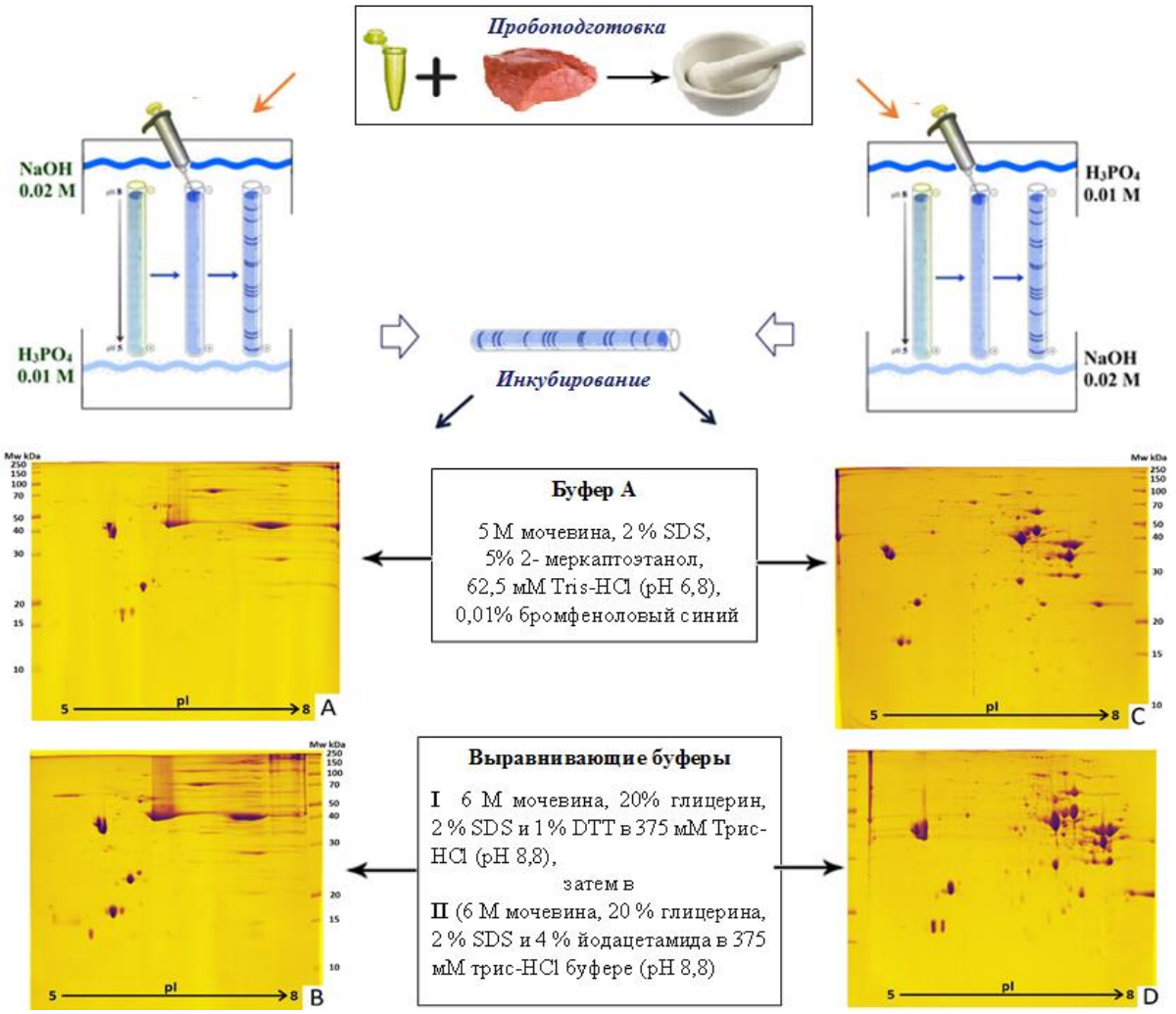

Рисунок 2 – 2-ДЭ *l. dorsi* свиньи. Условные обозначения: A, B – катодный вариант, C, D – анодный вариант.

Для выявления модификаций белкового состава мяса свиней в процессе роста проведено исследование мышц различной локализации (*l. dorsi*, *b. femoris* и *m. brachiocephalicus)* поросят-отъемышей. Фрагменты двумерных электрофореграмм, отображающих 18 фракций с показателем Fold> 2, представлены на рисунке 3.

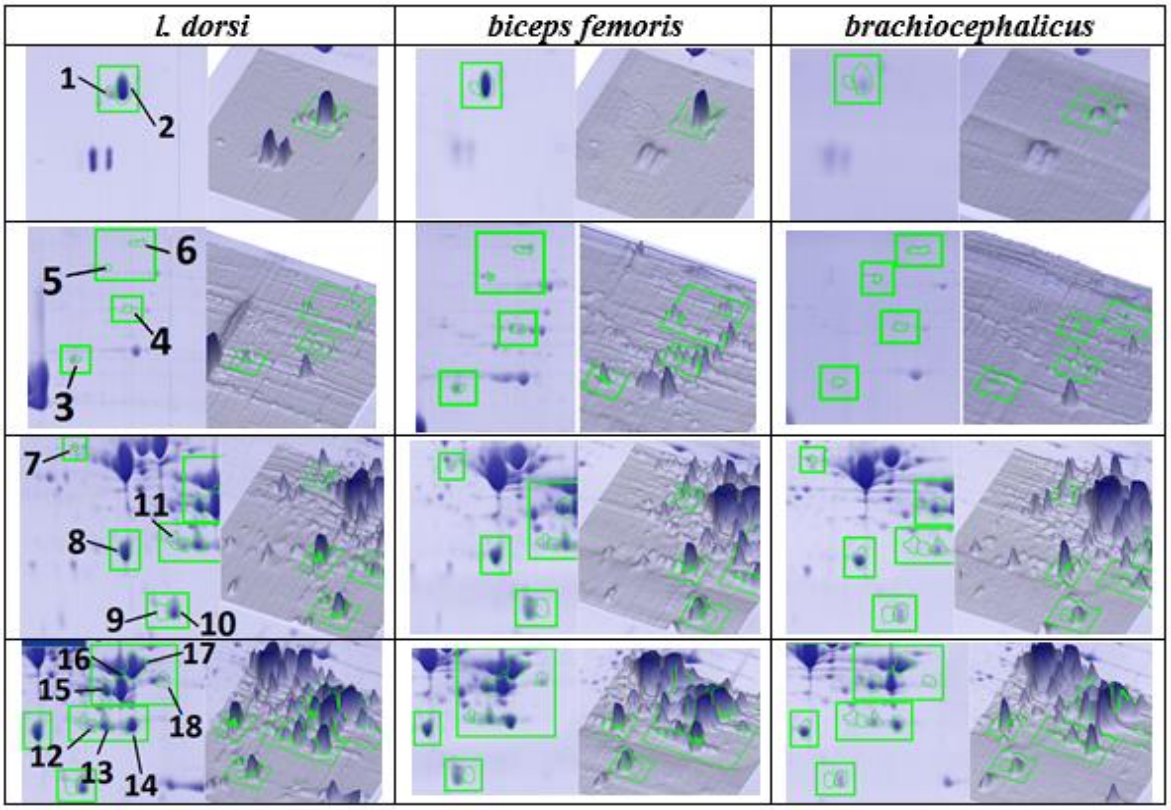

Рисунок 3 – Фрагменты 2-DE гелей мышечной ткани поросят-отъемышей.

Фракции 1 и 2 (рисунок 3), предположительно, миозиновые легкие цепи быстрых (MLC1f) и медленных (MLC1s/v) скелетных мышц, достаточно хорошо проявлялись в *l. dorsi*. В образцах *b. femoris* детектировалась только медленная цепь, а в *m. brachiocephalicus* – слабовыраженная фракция MLC1s/v. Группа белков в диапазоне молекулярных масс от 50 кДа до 60 кДа (№ 3–7, рисунок 3) более явно выражена в мышцах *b. femoris*, слабее в *l. dorsi*, а в мышцах *m. brachiocephalicus* выявлялась в меньших количествах.

Количество белка № 8 (рисунок 3) триозофосфатизомеразы 1 равномерно снижалось от *l. dorsi* до *m. brachiocephalicus*. Такая же тенденция наблюдалась у

фракций № 13–17, среди которых, предположительно, присутствуют фракции тропонинов. Белок скелетных мышц тропонин I уже охарактеризован как потенциальный термостабильный и видоспецифичный биомаркер мышечной ткани млекопитающих в сыром мясе и мясных продуктах (Zvereva et. al., 2015). Интересное распределение белковых пятен отмечено у фракций № 9 и № 10. Так, в *b. femoris* обнаруживался только белок № 9, и в небольшом количестве присутствовала фракция № 10 (аденилаткиназа), но при этом в *l. dorsi* его интенсивность была больше, чем в мышцах *м. brachiocephalicus*. Объём пятна № 11 в *m. brachiocephalicus* в три раза меньше, чем у *l. dorsi* и *b. femoris*. Самое большое значение показателя Fold отмечено у фракции № 12 (фосфоглицеральмутаза) интенсивность которой на порядок выше у *l. dorsi* по сравнению с *m. brachiocephalicus* и *b. femoris*. Белок № 18 более выражен в *b. femoris*, менее интенсивно отмечен в *l. dorsi* и в небольшом количестве в *m. brachiocephalicus*.

При сравнительном электрофоретическом исследовании мышечной ткани разной локализации **половозрелых свиней** (рисунок 4) различия в большей степени обнаружены в минорных белковых фракциях. Группа белков (№ 1–3, рисунок 4) в области более 70 кДа, такие как альфа-1,4-глюканфосфорилаза, аминоксидаза, актин-деполимеризующий фактор и белок теплового шока HSP 90-альфа в значительно большем количестве (Fold> 3,05) обнаруживалась в *m. brachiocephalicus*. Также, отмечено преобладание в *m. brachiocephalicus* белков CFL2b вариант 1 и тропонинов С быстрых и медленных скелетных мышц, отвечающих за связывание актиновых филаментов.

Среди структурных мышечных белков значимые отличия выявлены в фрагментах тропомиозина, миозиновых легких цепей 1 и αβ-кристаллина (№ 4, № 5, № 11 на рисунке 4), которые, как минимум, в два раза интенсивнее были обнаружены в тканях *b. femoris*. В соответствии с масс-спектрометрической идентификацией для *l. dorsi* определяющими фракциями стали № 6, № 10 и № 12, являющиеся миозиновыми легкими цепями 2, ациредуктон-диоксигеназой и гамма-

актином-2. Интересно отметить, что креатинкиназа (субъединица М) и длинноцепочечная 3-кетоацил-КоА-тиолаза выявлялись в минимальных количествах по сравнению с *b. femoris* и *м. brachiocephalicus*. При этом L-лактат дегидрогеназа А цепь и порин менее интенсивно отмечены в *b. femoris* (рисунок 4).

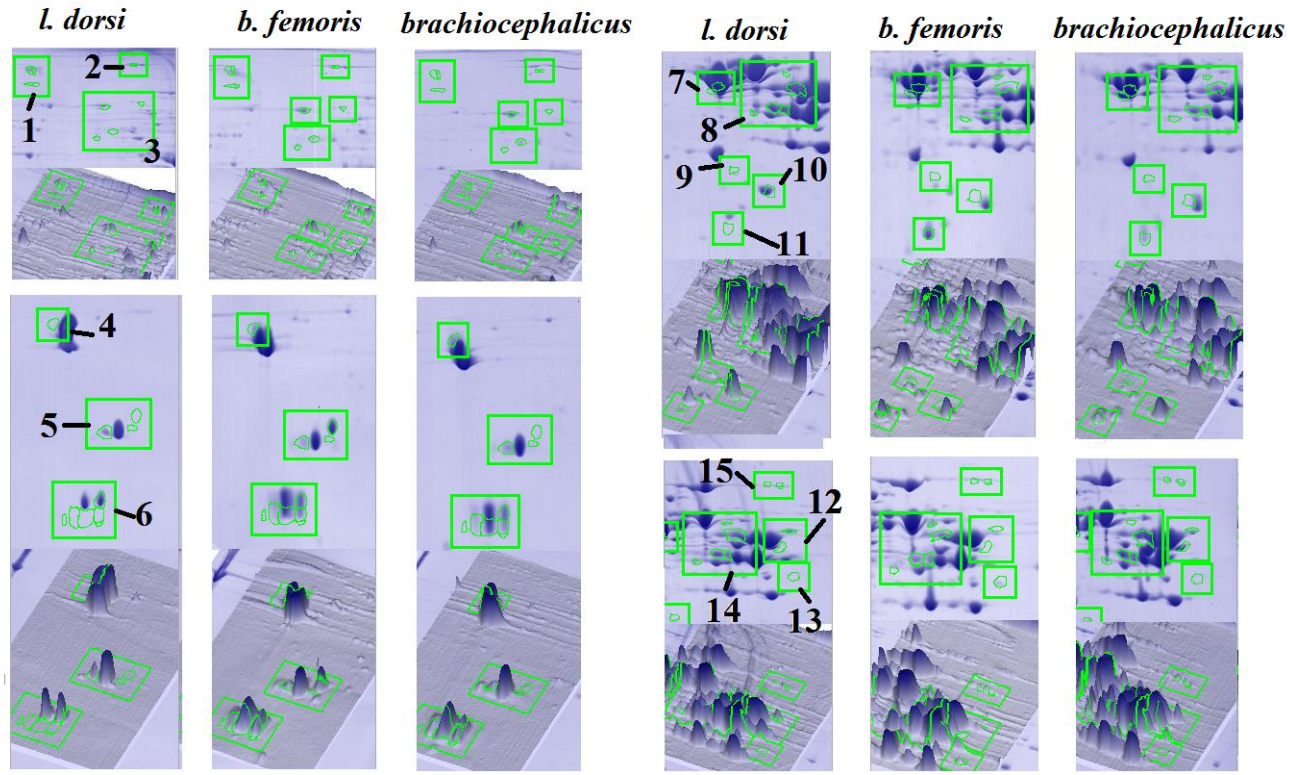

Рисунок 4 – Фрагменты 2-DE гелей мышечной ткани половозрелых свиней.

При сопоставлении мышц *l. dorsi* в процессе роста животного отмечено увеличение количества белковых фракций за счет увеличения структурных белков (актина, миозиновых легких цепей, триозофосфатизомеразы, пируваткиназы М, тропонинов, глицеральдегид-3-фосфатизомеразы, αβ-кристаллина и миоглобинов), которые у поросят представлены в меньшем количестве, но с большей концентрацией белка.

В случае *b. femoris* отмечена похожая тенденция увеличения количества белков за счет декомпозиции фракций при взрослении животного. В большей мере изменения коснулись миоглобинов, миозиновых легких цепей, тропонинов I, альдолазы А и белки теплового шока.

При изучении *m. brachiocephalicus* выявлено, что общее количество белковых фракций и их концентрация на полученных электрофореграммах по мере роста и развития животного сокращается. Преимущественно деформации подвергались белки с молекулярной массой менее 30 кДа и в большей степени белки актомиозионового комплекса.

Масс-спектрометрический анализ вырезанных полос с выраженными отличиями из одномерной электрофореграммы (рисунок 5) выявил 214 белков, по большей части, задействованных в клеточных и метаболических процессах, двигательной активности и локализации. В мышечной ткани *l. dorsi* идентифицирован белок роста и развития, посредством связывания рецептора семафорина и хеморепеллентной активности – семафорин-6Б (96,78 кДа). Также выявлены белки развития в *l. dorsi* и *b. femoris* кадгерин-13 (78,23 кДа), кадгерин-7 (87,01 кДа), F-актин-кэпирующая белковая субъединица бета (30,66 кДа) и два неохарактеризованных белка в 65,60 кДа и 63,88 кДа.

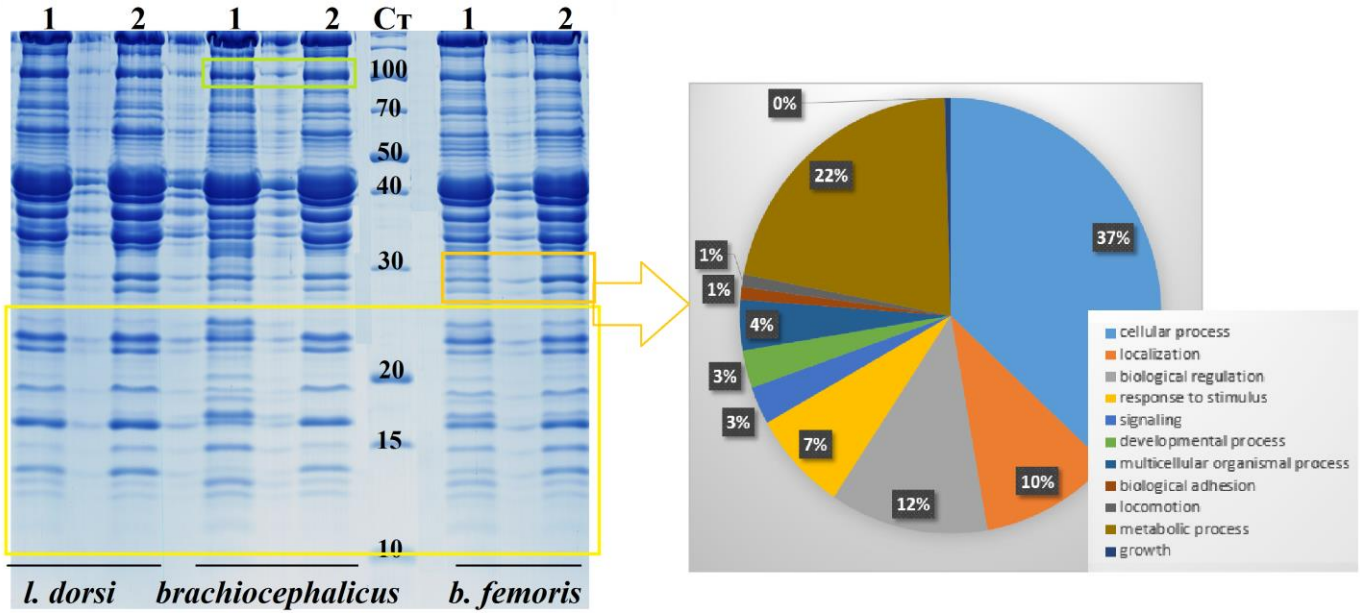

Рисунок 5 – Одномерная электрофореграмма мышц свиней в процессе роста (1 – поросята, 2 - половозрелые свиньи).

Описанные выше изменения белковых фракций могут отражать интенсивность процессов роста мышечной ткани у животных. Так, мышечные ткани поросят характеризуются высокой концентрацией белковых фракций, но меньшим

количеством белков, а по мере развития происходит их перераспределение – концентрация белков снижается, а количество увеличивается. Предположительно, это можно объяснить тем, что мышцы растущего животного подвергаются большему воздействию двигательных сил, а механическая передача сигналов через интегрины способствует синтезу белка. Так как рост и развитие мышечной ткани включает в себя непосредственно увеличение саркомеров, представляющие собой комплекс нескольких белков, таких как актин, миозин и тропонины, то соответственно и количественное содержание этих белков увеличивается в мышечной ткани взрослого животного.

Наиболее информативной для выявления различных воздействий является *l. dorsi* – наиболее мощная мышца позвоночного столба. В ней выявлено максимальное количество интенсивно окрашенных белковых фракций. Также двумерная карта функционально активной мышцы *b. femoris* является не менее информативной, так как в ней обнаружено большое количество белков. Уже известно, что пептиды, образующиеся в данной мышце, обладают биологической функциональностью (некоторые пептиды из белков MLC1, CK, MYO, TNT и MHC7 оказались наиболее влиятельными).

В результате изучения возможности применения метода двумерного электрофореза для оценки состава мясных продуктов на примере модельных фаршей с заданным количеством сырья были выбраны общие конститутивные фракции для всех изучаемых образцов, которые представлены на рисунке 6. Подобные исследования уже проводились другими учеными (Ковалева и др., 2012), но при более равном соотношении количества сырья (55 % : 45 %; 60 % : 40 %; 70 % : 30 %). В связи с этим были выбраны более чувствительные пороги определения.

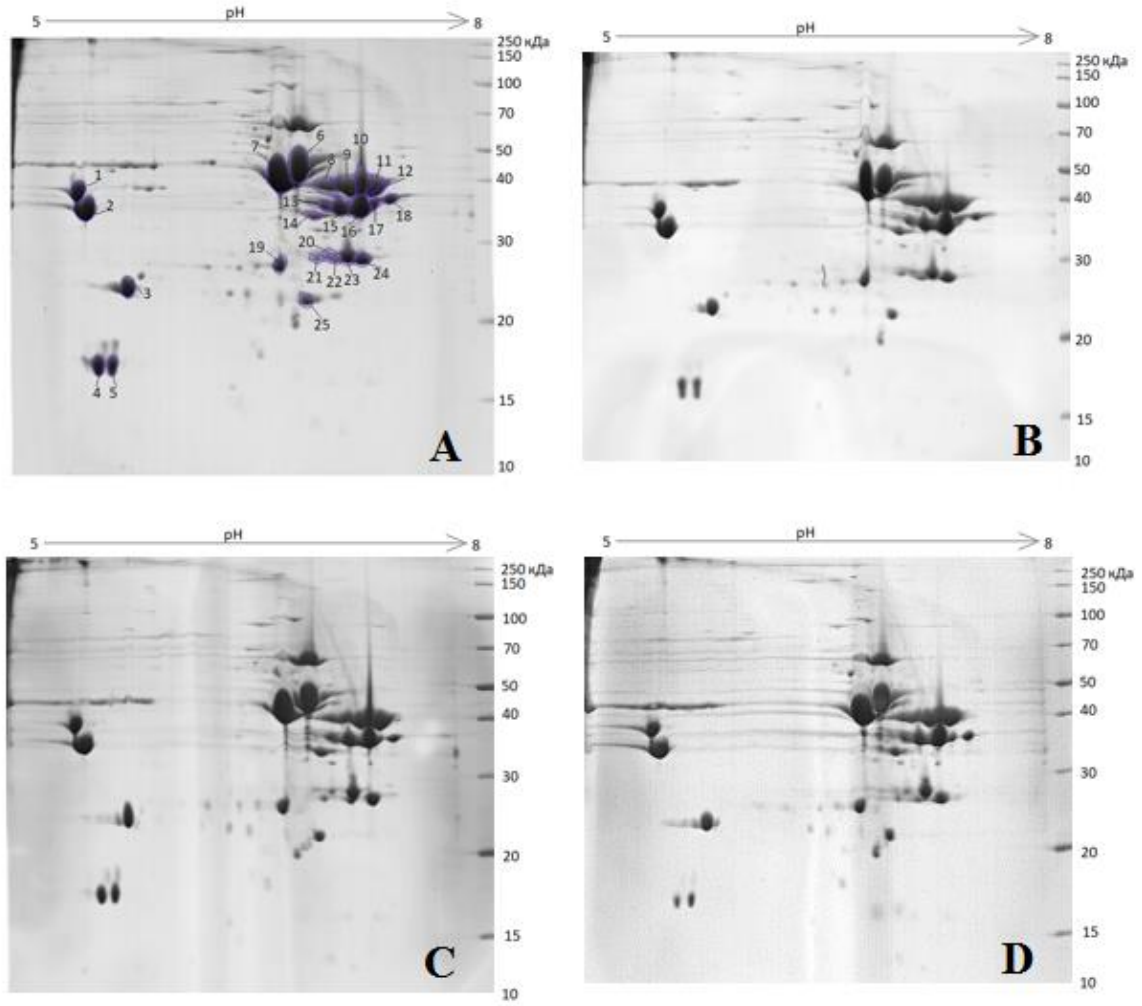

Рисунок 6 – Двумерная электрофореграмма модельных фаршей с различным содержанием говядины. Условные обозначения модельных фаршей из свиньи с добавлением говядины – длиннейшая мышца – с процентным соотношением: A – 0,01 : 99,99 %; B – 0,1 : 99,9 %; C – 1,0 : 99,0 %; D – 10,0 : 90,0 %.

Наибольшая концентрация белка исследуемых фракций отмечена в системе с 0,01 % содержанием говядины (рисунок 6 A), наименьшая – у образцов с 10,00 % содержанием говядины (рисунок 6 D). Среди выявленных конститутивных фракций наибольшей интенсивностью окрашивания характеризовались белковые пятна: тропомиозин альфа 1 (33,5 кДа), бета-енолаза (46,0 кДа) креатинкиназой субъединицей M (41,0 кДа) и тропонином T скелетномышечным (31,0 кДа), соответственно.

Количественное содержание фракций миозиновой легкой цепи 1/3 (21,5 кДа) и бета-енолазы (46,0 кДа) снижалась на 19,52 % и 31,34 % при увеличении доли говядины в фарше от 0,01 % до 10,00 % соответственно. Данные фракции могут выступать в качестве кандидатов-биомаркеров при оценке состава мясных продуктов, поскольку на двумерных электрофореграммах модельных фаршей отмечена линейная зависимость интенсивности указанных белковых пятен при изменении количества говядины.

Известно, что условия обработки, особенно температура, вызывают каскад химических и физических изменений, влияющих на белки мяса, включая денатурацию и агрегацию, сокращение волокон и солюбилизацию коллагена, реакцию Майяра или окисление. Для определения влияния различных температур на биохимические изменения в мясных системах, влияющих на пищевые качества мясных белков, был проведен сравнительный анализ двумерных карт.

Сравнительный анализ двумерных карт фаршевых систем позволил выявить, что наибольшее количество белковых фракций наблюдалось у нативного (сырого) фарша. После заморозки отмечено снижение количества белков: не обнаруживался тропомиозин β-цепь (ТПМ2 33,5 кДа; pI 4,80); снижалась концентрация пятен карбоангидразы 3 (30,5 кДа; pI 7,55), αβ-кристаллина (20,0 кДа; pI 7,60) и миозиновой легкой цепи 1 (МЛЦ1 21,0 кДа; pI 4,90). В образце фарша после тепловой обработки выявлена декомпозиция группы белковых фракций с диапазоном молекулярных масс от 65 кДа до 250 кДа, соединения распадались на наборы пятен одноименных фракций, присутствующих в нативном фарше, а часть белков не детектировались на 2Д-электрофореграмме: МЛЦ3 (16,8 кДа; pI 4,53), белок, связывающий жирные кислоты 3 (мышечная изоформа 13,0 кДа; pI 5,60), аденилаткиназа изоэнзим 1 (23,0 кДа; pI 6,40), альфа субъединица гемоглобина (15,5 кДа; pI 9,15) и другие минорные фракции. Фракция тропомиозина альфа 1 (ТПМ1 33,5 кДа; pI 4,71) сохранялась во всех образцах.

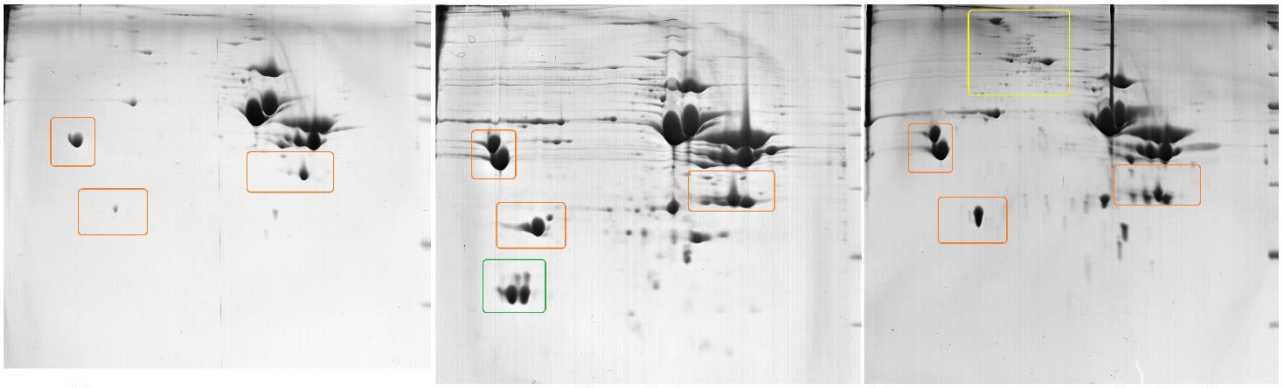

Рисунок 7 – 2ДЭФ фаршей после различной термической обработкой.

После тепловых воздействий (отрицательном и положительном) наблюдалось деградационное влияние на миозиновые легкие цепи 2 (МЛЦ2 19,0 кДа; pI 4,89). Схожая картина происходила с фракцией триозофосфатизомеразой 1 (ТПИ1 23,0 кДа; pI 6,80), интенсивно выраженной в сыром фарше. Данная фракция отсутствовала в образце после заморозки и обнаруживалась в небольшом количестве после варки. Это связано с тем, что при воздействии отрицательных температур кристаллы воды разрывают клеточную стенку и вместе с жидкостью теряется часть белков при размораживании, а в случае варки рвутся некоторые водородные связи, удерживающие полипептидные цепи в белковой молекуле, инициируя небольшие структурные изменения.

Миозиновая легкая цепь изоформа 2V (МЛЦ2 2V 18,5 кДа; pI 4,89) явно была выражена в нативном фарше и полностью отсутствовала в образцах после термической обработки. Бета-енолаза (ENO3 46,0 кДа; pI 8,10) также интенсивно проявлялась в сыром фарше, была менее выражена в образцах после варки и в незначительном количестве наблюдалась после замораживания.

Такие интерпретации могут обеспечить понимание влияния различных методов обработки пищевых продуктов на биохимические изменения белковых фракций и акцентировать внимание на биофункциональных и питательных качествах белков мяса.

Интересно отметить, что фракции миозиновых легких цепей реагировали на все вышеперечисленные процессы: меняются в процессе роста и в разных частях туши, а также в процессе переработки, что делает их перспективным универсальным биомаркером мышечной ткани при различных воздействиях.

Исследования показателей качества кусковых мясных консервов первоначально производятся в средней пробе образца. Однако выявлено, что это не позволяет получить качественное разделение белковых компонентов. Для повышения разрешающей способности метода было предложено отделить жировую составляющую по ГОСТ 33741-2015 и провести исследования отдельных компонентов (рисунок 8).

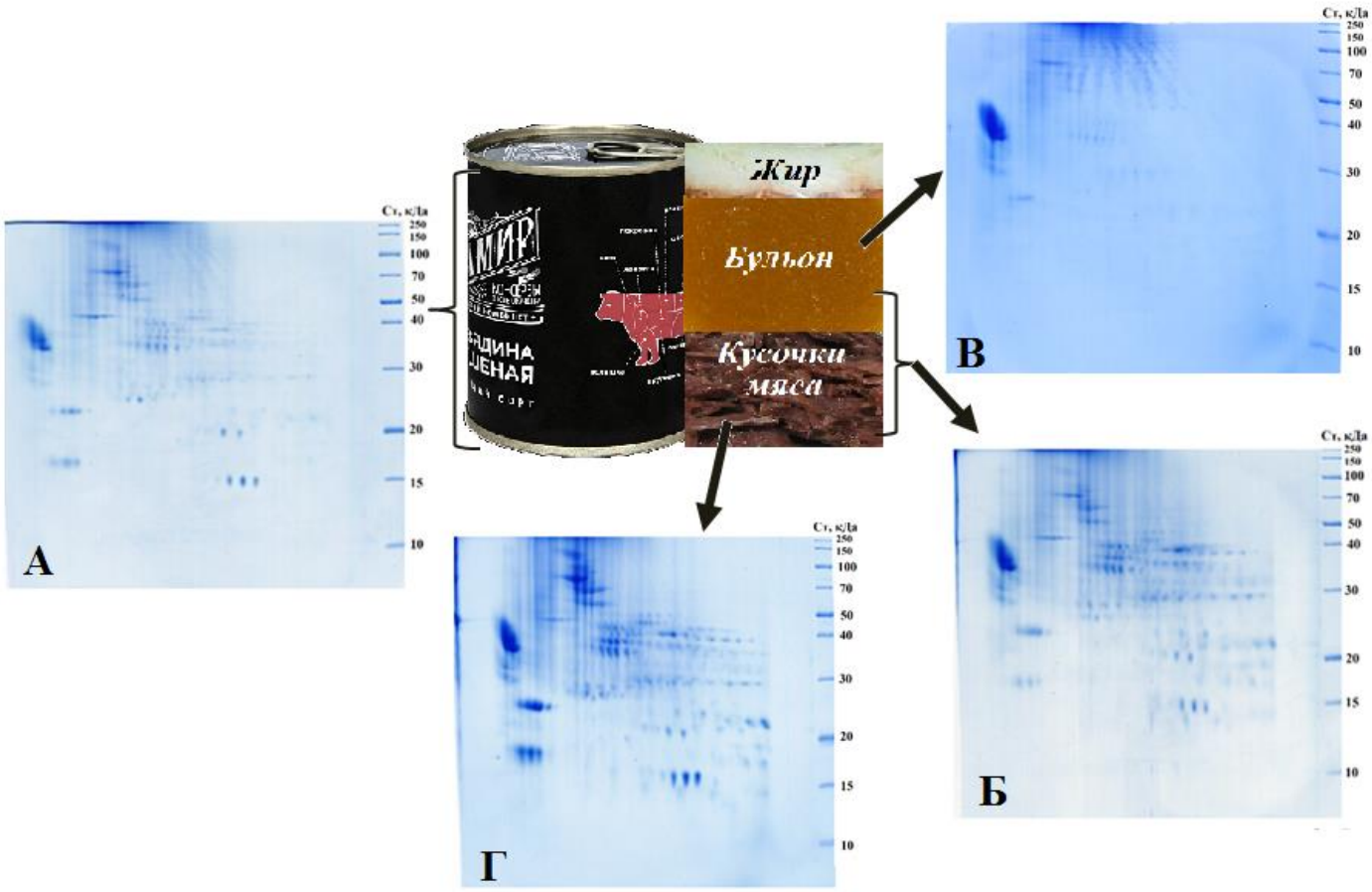

Рисунок 8 - 2ДЭФ мясных кусковых консервов (говядина) и их составляющих. Условные обозначения: А – средняя проба; Б – мясо и бульон; В – бульон; Г – кусочки мяса; СТ – стандарт

Результаты электрофоретического разделения белков средней пробы образца, включающего все содержимое консервов (жир, бульон, кусочки мяса) обнаружили в небольших количествах фрагменты основных мышечных и соединительнотканных белков говядины, но из-за большого количества жира, который обладает плохой электропроводностью, электрофореграмма малоинформативна (рисунок 8 А).

При отдельном электрофоретическом изучении бульона (рисунок 8 В) выявлено большое количество интенсивно окрашенных высокомолекулярных фракций с массой более 50 кДа, вероятно, коллагеновых цепей соединительной ткани, а также митохондриальной аконитазы 2, белков теплового шока, фракций десмина и пируваткиназы М.

Наиболее информативную картину удалось получить при исследовании твердой части мясных кусковых консервов (рисунок 8 Г). Выявлено большое количество белков во всем диапазоне молекулярных масс, включая основные структурные фракции бета-енолазы, мышечной креатинфосфокиназы, фосфоглицераткиназы 1, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, группы тропонинов и миозиновых легких цепей.

Схожая тенденция распределения белковых фракций была получена при анализе двумерных электрофореграмм кусковых консервов из свинины. Электрофореграмма средней пробы была мало информативна, как и отдельное изучение бульона. Наибольшее распределение белков выявлено при отдельном изучении кусочков мяса, достаточно хорошо обнаруживались белки-предшественники основных мышечных белков свиньи (МЛЦ, тропонины, тропомиозины, бета-енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и др.). Также высокого разрешения электрофореграммы удалось достичь при совмещенном изучении бульона и кусочков мяса, более интенсивно проявлялись кислотные белки.

ВЫВОДЫ

1. Результаты анализа литературных данных и экспериментальных исследований показали, что наиболее информативным вариантом для разделения белков мышечной ткани с помощью двумерного электрофореза является анодный вариант, когда изменено направление тока. В качестве инкубирующих растворов ИЭФ-гелей могут выступать буфер А (5 М мочевина, 2 % SDS, 5 % меркаптоэтанол, 62,5 мМ Tris-HCl, 0,01 % бромфеноловый синий) и выравнивающие буферы (6 М мочевина, 20 % глицерина, 2 % SDS и 1 % DTT(I)/4 % йодацетамид (II) в 375 мМ Трис-HCl). С помощью денситометрического анализа гелей подтверждена эффективность разработанного метода пробоподготовки: при таком варианте выявляется, как минимум, в два раза больше количество белков и увеличивается интенсивность их проявления.

2. Сравнительные протеомные исследования мышц поросят-отъемышей и взрослых животных показали, что в процессе роста и развития происходит увеличение числа фракций тропонинов, легких миозиновых цепей и белков актомиозинового комплекса, но при этом происходит снижение их количественного содержания. Выявленные изменения белковых соединений отражают интенсивность процессов развития мышечной ткани у животных, способствующие контролю закономерностей формирования заданных качественных показателей мяса и мясных продуктов.

3. Посредством двумерного электрофореза выявлены основные группы модифицируемых мышечных белков модельных фаршевых систем после различных температурных воздействий. Отрицательная температура (минус 40 °С) приводит к потерям части структурных белковых соединений (триозофосфатизомеразы 1, миозиновых легких цепей 2 и тропомиозина β-цепь); тепловая обработка – к декомпозиции ряда белков с молекулярной массой выше 65 кДа (миозиновые легкие цепи 2 и миозиновые легкие цепи 3), а часть белков не детектировались на 2Д-

электрофореграмме (МЛЦ3, белок, связывающий жирные кислоты 3 мышечная изоформа, аденилаткиназа изозим 1, альфа субъединица гемоглобина).

4. Адаптированы условия разделения белковой составляющей для кусковых мясных консервов; посредством разделения и удаления жировой составляющей продукта получены их протеомные карты. Для определения общего спектра белков целесообразно электрофоретическое изучение совмещенно бульона и кусочков мяса. Изучение компонентов консервов методом двумерного электрофореза позволяет в отношении бульона проводить сравнительный анализ длинноцепочечных белков; в отношении мясной составной части – изучить вариации тканевых белков.

5. Разработаны и утверждены методические рекомендации по анализу результатов одно- и двумерных электрофореграмм, позволяющих интерпретировать полученные результаты после проведения электрофоретического исследования, используя информационные ресурсы. Разработан СТО 00419779-000-2021 Консервы кусковые мясные и мясосодержащие. Методика подготовки проб для проведения 2D – электрофореза.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНО В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

Статьи, индексируемые в международных базах данных Web of Science и Scopus

1. Chernukha, I. A comparative study of *Sus scrofa m. Longissimus dorsi* with different changes in quality / I. Chernukha, **A. Akhremko**, E. Kotenkova // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2017 – Vol. 11. – №. 1. – P. 398-402. https://dx.doi.org/10.5219/769 (Scopus, Q3: SJR 0,27)
2. Chernukha, I. Hypolipidemic action of the meat product: In vivo study / I. Chernukha, L. Fedulova, E. Kotenkova, **A. Akhremko** // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2018. – Vol. 12. – № 1. – P. 566-569. https://doi.org/10.5219/959 (Scopus, Q3: SJR 2019=0,27)
3. Vasilevskaya, E. R. Proteomic study of pig's spleen / E. Vasilevskaya, **A. Akhremko** // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2019. – Vol. 13. – № 1. – P. 314-317. https://doi.org/10.5219/1093 (Scopus, Q3: SJR=0,27)

4. Zolotarev, N. Directional proteolysis of secondary raw / N. Zolotarev, O. Fedotova, E. Agarkova, **A. Akhremko**, O. Sokolova // News of the national academy of sciences of the republic of Kazakhstan series chemistry and technology – 2020. - Vol. 5. - № 443. – P. 77-84. https://doi.org/10.32014/2020.2518-1491.83 (WoS, SJR=0,21)

5. **Akhremko, A**. Adaptation of two-dimensional electrophoresis for muscle tissue analysis / A. Akhremko., E. Vasilevskaya, L. Fedulova // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2020. - Vol. 14. - №. 1. - P. 595-601. https://doi.org/10.5219/1380 (Scopus, Q3: SJR=0,27)

6. **Akhremko, A**., Comparative study of weaning pigs' muscle proteins using two-dimensional electrophoresis / A. Akhremko, L. Fedulova // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2021. – Vol. 15. – P. 52-57. https://doi.org/10.5219/1449 (Scopus, Q3: SJR=0,27)

7. **Akhremko A.** The study of the main porcine muscle proteins and its modifications // FEBS OPEN BIO. – 2021. – Vol. 11. – Suppl. 1. – P. 161-161. (WoS, Q3). WOS:000668898600468

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. Vasilevskaya, E.R. Study of the functional product's protein compounds digestion features / E.R. Vasilevskaya, **A.G. Akhremko**, E.K. Polishchuk**,** L.V. Fedulova // Theory and Practice of Meat Processing. – 2020. – Т. 5. – № 3. – С. 18-21. https://doi.org/10.21323/2414-438X-2020-5-3-18-21

2. **Ахремко, А.Г.** Применение протеомных технологий для изучения тимуса, селезенки и мезентеральных лимфатических узлов свиней / А.Г. Ахремко, Л.В. Федулова, Е.Р. Василевская // Все о мясе. – 2019. – № 1. – С. 54 – 57. https://doi.org/10.21323/2071-2499-2019-1-54-57

3. **Ахремко, А. Г.** Применение метода двумерного электрофореза для оценки состава мясных продуктов на примере модельных фаршей // Все о мясе. – 2019. – №. 3. – С. 46-48. https://doi.org/10.21323/2071-2499-2019-3-46-48

4. Василевская, Е. Р. Методология изучения переваривания и всасывания белков пищевых продуктов in vitro / Е.Р. Василевская, **А.Г. Ахремко**, А.С. Грызлова, Е.А Иванова // Все о мясе. – 2019. – №. 6. – С. 42-44. https://doi.org/10.21323/2071-2499-2019-6-42-44

5. Chernukha, I. M., **Akhremko A. G.** Assessing the effect of thermal treatment on meat proteins using proteomic methods / I.M. Chernukha, A.G. Akhremko //Theory and practice of meat processing. – 2019. – Т. 4. – №. 3. – С. 4-6. https://doi.org/10.21323/2414-438X-2019-4-3-4-6

6. **Ахремко, А. Г.**, Арюзина М. А. Изучение протеома мышц *L. dorsi* свиней-реконвалесцентов после направленного операционного воздействия / А.Г. Ахремко, М.А. Арюзина // Все о мясе. – 2020. – № S5. – С. 46-48. https://doi.org/10.21323/2071-2499-2020-5S-46-48

7. **Ахремко, А.Г.** Методы определения содержания мясных белков в мясных продуктах / А.Г. Ахремко, В.А. Пчелкина, Е.А. Котенкова, И.М. Чернуха // Все о мясе. – 2017. - № 2. – С.46-48.

8. Чернуха, И.М. Сравнительное изучение автолитических изменений протеома мышечной ткани свинины и говядины / И.М. Чернуха, **А.Г. Ахремко** // Теория и практика переработки мяса. – 2018. – Том 3. – № 3. – С. 56-63. https://doi.org/10.21323/2414-438X-2018-3-3-56-63.

9. Афанасьев, Д.А. Влияние стартовых культур на технологические и биохимические показатели сырокопченых колбас / Д.А. Афанасьев, Д.Л. Клабукова, Н.Г. Машенцева, **А.Г. Ахремко**, А.В. Куликовский, И.М. Чернуха // Мясная индустрия. – 2016. – № 12. – С. 18–22.

Материалы симпозиумов, конгрессов, конференций

1. **Ахремко, А.Г.** Анализ мясного сырья и продуктов методом двумерного электрофореза / А.Г. Ахремко // Тезисы докладов XII Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств», «Могилевский государственный университет продовольствия», Беларусь. – 22-23 апреля 2021. – С. 134.

2. Харкевич, Л.Ю. Применение электрохимических методов в изучении автолитических процессов / Л..Ю. Харкевич, В.Д. Резниченко, И.С. Стрельченко, **А.Г. Ахремко** // Тезисы докладов XII Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств», «Могилевский государственный университет продовольствия», Беларусь. – 22-23 апреля 2021. – С. 112.

3. **Ахремко, А.Г.** «Вариабельность протеома мышечной ткани при росте и развитии животного» / А.Г. Ахремко // В сборнике: докладов XIV международного биотехнологического форума «РОСБИОТЕХ-2020». – 2020. – С. 156-158. (РИНЦ)

4. Василевская, Е.Р. Мясное сырье с заданными характеристиками как результат направленного изменения протеостаза / Е.Р. Василевская, **А.Г. Ахремко**, М.А. Арюзина, Л.В. Федулова // В сборнике: докладов XIV международного биотехнологического форума «РОСБИОТЕХ-2020». – 2020. – С. 112-115. (РИНЦ).

5. **Akhremko, A.** Identification of pig's immune organs proteins for creation immuno regulator / A. Akhremko, E. Vasilevskaya /A. Akhremko // Сборник материалов международного конгресса «XIII Annual Congress of the European Proteomics Association: «rom genes via proteine and their interaction to function», 24.03.2019 – 27.03.2019. – Германия, Потсдам. – P. 94

6. **Ахремко, А.Г.** Изучение тимуса как источника функциональных белков протеомными методами / А.Г. Ахремко, Е.Р. Василевская, Л.В. Федулова // спецвыпуск Acta Naturae – 2019. – Т. 2 – С. 77-78.

7. **Ахремко, А.Г.** Протеомика и наука о питании / А.Г. Ахремко // Сборник материалов Международной конференции молодых ученых «Молодежь в науке 2017». – 2018. – Республика Беларусь, Минск. – С. 257-262.

8. Федулова, Л.В. Сравнительные исследования протеома *M. longissimus dorsi* свиней при различном характере автолиза / Л.В. Федулова, **А.Г. Ахремко**, И.М. Чернуха // Сборник XI Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств». – 2017. – Республика Беларусь, Могилев. – С. 10-12.

9. Федулова, Л.В. Сравнительные исследования протеома *M. longissimus dorsi* свиней при различном характере автолиза / Л.В. Федулова, **А.Г. Ахремко**, И.М. Чернуха // Сборник XI Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств» – 2017. – Республика Беларусь, Могилев. – С. 168.

10. Ахремко, А.Г. Оптимизация пробоподготовки мясных продуктов для SDS-PAGE / А.Г. Ахремко // X Международная конференция молодых ученых и специалистов ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова» – 2016. – Россия, Москва. – С. 25-28.