На правах рукописи

АФАНАСЬЕВ ДМИТРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ КОЛБАС, ОБОГАЩЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ПЕПТИДАМИ

Специальность 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств
Специальность 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание степени
кандидата технических наук

Москва – 2022

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

Научный руководитель:	доктор технических наук **Машенцева Наталья Геннадьевна**
Официальные оппоненты:	**Тихонов Сергей Леонидович** доктор технических наук, профессор, Уральский государственный экономический университет, Институт торговли, пищевых технологий и сервиса, заведующий кафедрой пищевой инженерии
	Неминущая Лариса Анатольевна доктор биологических наук, доцент, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, отдел обеспечения качества лекарственных средств для ветеринарии и животноводства, ведущий научный сотрудник
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления»

Защита диссертации состоится «___» _____2022 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 «_____» _____ 2022 г

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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние годы во всем мире активно проводятся исследования по изучению состава и свойств веществ белковой и пептидной природы, содержащихся в мясном сырье и готовых мясных продуктах. Эти соединения образуются на различных этапах технологической обработки и обусловливают качественные и функциональные характеристики, представленные иммуномодулирующей, антимикробной, противораковой и другими активностями, а также безопасность готовых продуктов.

Биологически активные пептиды (БАП) формируются в процессе деструкции мажорных белков мышечной ткани при протекании автолитических процессов и в процессе обработки мясного сырья ферментами растительного, животного и микробного происхождения, а также стартовыми культурами. Наличие у стартовых культур широкого спектра ферментативных активностей, в том числе протеолитических ферментов эндо- и экзо- типов, позволяет им в разной мере гидролизовать саркоплазматические и миофибриллярные белки мышечной ткани с образованием низкомолекулярных продуктов гидролиза, среди которых могут идентифицироваться и БАП. Различия, обнаруженные в протеиназах молочнокислых бактерий, объясняют разнообразие полученных биоактивных пептидов, даже когда используется один и тот же белковый матрикс (Kieliszek M. и др., 2021, Razzaq A. и др., 2019). Однако комплексное изучение механизмов формирования БАП на молекулярном уровне освещено недостаточно.

Представленные исследования расширят знания о протеолизе мышечной ткани ферментами стартовых культур, происходящем при производстве ферментированных мясных продуктов, а также будут свидетельствовать о потенциале данного вида продукции как естественного источника биологически активных пептидов.

Степень разработанности темы. Научными и прикладными исследованиями в области применения стартовых культур с целью получения биологически активных пептидов из мясного сырья и готовых мясных продуктов занимались такие отечественные и зарубежные ученые как Лисицын А.Б., Чернуха И.М., Машенцева Н.Г., Arihara K., Fadda S., Katayama K., Keska P., Lafarga T., Mora L., Sakata R., Stadnik J.

Отдельные этапы работы выполнены в рамках гранта РНФ № 16-16-10073 и 16-16-10073П «Изучение механизмов биосинтеза и деградации специфических биологически активных белков и пептидов под действием ферментативного и неферментативного протеолиза тканей *Sus scrofa* и *Bos taurus* и разработка на их основе специализированных пищевых продуктов» (2016–2020 гг.).

Цель и задачи исследования. Целью исследования является разработка технологии ферментированных стартовыми культурами колбас, способствующих образованию биологически активных пептидов.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- провести скрининг протеолитических стартовых культур, в т.ч. определить наличие в их геноме генов протеолитической активности;
- осуществить ферментацию мясного сырья и его протеомный анализ;
- разработать бактериальный препарат из перспективных в отношении протеолиза мясного сырья стартовых культур;
- провести выработку ферментированных бактериальным препаратом сырокопченых колбас, определить их органолептические, физико-химические, гистологические и микробиологические показатели и провести протеомный анализ;
- выявить пептидные последовательности, представляющие наибольший интерес в отношении проявления биологической активности, и осуществить их идентификацию с помощью методов биоинформатики;
- разработать схему направленного отбора стартовых культур, способствующих образованию биологически активных пептидов в мясном сырье и готовых мясных продуктах.

Научная новизна исследования. Диссертационная работа содержит элементы научной новизны пунктов 1, 4, 6, 7 паспорта специальности 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств, а также пунктов 1, 3, 6, 11 паспорта специальности 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ.

Определена протеолитическая активность микроорганизмов качественным тестом на разжижение желатина и исследованием их внутриклеточных экстрактов по методу Ансона. Из всех исследуемых штаммов наибольшей протеолитической активностью обладают *P. acidilactici* 38, *P. acidilactici* 28, *S. carnosus* 108, *L. acidophilus* 45, *L. sakei* 105, *L. curvatus* 1, *P. pentosaceus* 106, *L. curvatus* 2 и *L. plantarum* 22/2. Наличие различного набора генов протеиназ семейства PrtP, наиболее изученных и часто встречаемых в геноме молочнокислых микроорганизмов, обнаружено в штаммах *L. casei* 10, *L. curvatus* 1, *L. sakei* 105, *L. acidophilus* 45, *P. acidilactici* 38, *P. acidilactici* 28, *L. sakei* 103, *L. curvatus* 2, *P. pentosaceus* 106, *S. carnosus* 108.

Установлено и описано характерное протеолитические воздействие стартовых культур на мясные белки. Протеомное исследование методом одномерного электрофореза (1-ДЭ) образцов мышечной ткани, ферментированных стартовыми культурами *P. pentosaceus* 106, *P. acidilactici* 38, *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 1, выявило деструктивные изменения в таких мажорных белках, как десмин, эластин, α-актин, легкие цепи миозина 1/3 и тропонин Т, а также свидетельствовало о деструкции актомиозинового комплекса. Исследование образцов методом двумерного

электрофореза (2-ДЭ) показало деструктивные изменения в ряде тканевых ферментов, а также в легкой цепи миозина 1/3, что было наиболее характерно для образца с *L. sakei* 105.

Показано, что бактериальный препарат на основе штаммов *L. curvatus* 1, *P. acidilactici* 38 и *S. carnosus* 108 оказывал наиболее выраженный эффект на белки ферментированного мясного продукта по сравнению с импортным бактериальным препаратом Bactoferm SM 194 компании «Christian Hansen». Так, ряд тканевых ферментов распадался приблизительно в 2 раза быстрее, фрагменты тяжелых и легких цепей миозина приблизительно в 2–3 раза быстрее, чем в образце с импортным бактериальным препаратом, а фрагменты миоглобина подверглись полной деструкции.

Установлено, что в результате обработки мышечной ткани КРС культурами *P. pentosaceus* 106, *P. acidilactici* 38, *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 1 образовались биологически активные пептиды SDEEVEHVEEEYEEEEE и TKQEYDEAGPSIVHRK, потенциально обладающие противоопухолевой активностью. Из образца сырокопченой колбасы, выработанного с использованием разработанного бактериального препарата, выделен пептид NAWGKVEADVAGHGQ, обладающий противоопухолевой и антимикробной активностями.

Теоретическая и практическая значимость. Отобраны стартовые культуры *L. casei* 10, *L. curvatus* 1, *L. sakei* 105, *L. acidophilus* 45, *P. acidilactici* 38, *P. acidilactici* 28, *L. sakei* 103, *L. curvatus* 2, *P. pentosaceus* 106, *S. carnosus* 108, обладающие высоким протеолитическим потенциалом.

Разработан бактериальный препарат «ФермБиакт» на основе штаммов *L. curvatus* 1, *P. acidilactici* 38 и *S. carnosus* 108, проект нормативной и технической документации (ТУ и ТИ) на него, а также получен патент № RU 2753890 C1 «Препарат бактериальный протеолитический для производства ферментированных мясных изделий».

Осуществлена опытно-промышленная выработка сырокопченых колбас с применением разработанного бактериального препарата «ФермБиакт» на предприятии «Экопрод» (г. Ивантеевка, Московская область). Проведена органолептическая, физико-химическая и гистологическая оценка образцов сырокопченых колбас, подтверждающая их полное соответствие сухим сырокопченым колбасам. Микробиологическая оценка молекулярно-генетическим и протеомным методами подтвердила развитие в образцах внесенных стартовых культур.

Разработана схема направленного отбора протеолитических стартовых культур, способствующих образованию биологически активных пептидов в мясном сырье и готовых мясных продуктах.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс и легли в основу учебного пособия «Биологически активные пептиды: роль ферментолиза в их образовании» для студентов направлений подготовки бакалавров 19.03.01 – Биотехнология и магистров 19.04.01 – Биотехнология.

Методология и методы исследования. При выполнении работы использовались общепринятые микробиологические, биохимические, физико-химические, органолептические, гистологические и статистические методы исследования.

Микробиологическая картина сырокопченых колбас была исследована молекулярно-генетическим методом T-RFLP и протеомным методом MALDI.

Протеомные методы исследования белкового профиля мясного сырья и сырокопченых колбас включали электрофоретическое разделение, компьютерную денситометрию, масс-спектрометрическую идентификацию, а также методы биоинформационного анализа *in silico*.

Основные положения, выносимые на защиту.

Скрининг штаммов, обладающих протеолитической активностью, в т.ч. имеющих гены протеиназ семейства PrtP.

Разработка бактериального препарата на основе протеолитических стартовых культур *L. curvatus* 1, *P. acidilactici* 38 и *S. carnosus* 108 для ферментированных мясных продуктов.

Получение биоактивных пептидов противоопухолевого и антимикробного действия в ферментированном мясном сырье и готовом ферментированном продукте (сырокопченая колбаса) стартовыми культурами или их композицией.

Анализ функционального потенциала идентифицированных пептидов с использованием биоинформатических баз данных.

Разработка схемы направленного отбора стартовых культур, способствующих образованию биологически активных пептидов в мясном сырье и готовых мясных продуктах.

Достоверность полученных результатов. Степень достоверности представленных результатов подтверждается достаточным уровнем полученных данных с использованием современных методов исследований. Научные положения базируются на общедоступных достижениях как фундаментальных, так и прикладных научных дисциплин, связанных с тематикой диссертационной работы. Все полученные результаты статистически обработаны с помощью программного обеспечения «SPSS Statistics 23.0».

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором лично и включает анализ научно-технической литературы, выбор и обоснование экспериментальных методов исследований, выполнение эксперимента, обобщение полученных результатов, выводы по работе.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были предметом докладов на научных конференциях, форумах, конгрессах: международной конференции «Развитие пищевой и перерабатывающей промышленности России: кадры и наука» (Москва, 2017); национальной научно-практической конференции «Биотехнология и продукты биоорганического синтеза» (Москва, 2018); I международной научно-практической конференции «Передовые пищевые технологии: состояние,

тренды, точки роста» (Москва, 2018); 60th International Meat Industry Conference, MEATCON 2019 (Санкт-Петербург, 2019); XIV международном биотехнологическом форуме «РОСБИОТЕХ-2020» (Москва, 2020); VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 1 публикация в издании, индексируемом международной базой данных Web of Science, 2 публикации, индексируемые международной базой данных Scopus, 5 публикаций в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 учебно-методическое пособие, 1 патент.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы из 173 наименований и 9 приложений. Основное содержание работы изложено на 144 страницах, включает 8 таблиц и 19 рисунков.

ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определены объекты исследования и представлена схема проведения эксперимента (рис. 1). Объектами исследования являлись:

- стартовые культуры *Pediococcus acidilactici* 38, *Pediococcus acidilactici* 28, *Staphyloccus carnosus* 108, *Lactobacillus acidophilus* 45, *Latilactobacillus sakei* 103, 104 и 105, *Staphyloccus carnosus* 301-2, *Latilactobacillus curvatus* 1, *Pediococcus pentosaceus* 55 и 106, *Staphyloccus xylosus* 96, *Lacticaseibacillus casei* 10, *Latilactobacillus curvatus* 2, , *Lactiplantibacillus plantarum* 22/2, *Pediococcus pentosaceus* 27 из коллекции ФГБОУ ВО МГУПП. Все штаммы депонированы в БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт». Штаммы отобраны по своим промышленно-ценным свойствам и разрешены к использованию в пищевой промышленности на территории Российской Федерации Роспотребнадзором;

- мышечная ткань КРС (m. *L. dorsi, Bos taurus*), которая инъецировалась клеточной суспензией концентрацией $1{,}2\times10^9$ КОЕ/мл из расчета 1 мл суспензии на 10 г мышечной ткани. Ферментация проводилась в течение 12 сут при температуре 10±2 °С в условиях вакуума для предотвращения развития аэробной гнилостной микрофлоры (7–9);

- протеолитический бактериальный препарат «ФермБиакт» из стартовых культур *P. acidilactici* 38, *L. curvatus* 1 и *S. carnosus* 108 в равном соотношении, отсутствие антагонизма между которыми определено методом перпендикулярных штрихов (10);

- сырокопченые колбасы, выработанные (11) без стартовых культур / с использованием бактериального препарата «ФермБиакт» / с использованием бактериального препарата Bactoferm SM 194 компании «Christian Hansen» (Дания), выработанные на предприятии «Экопрод» (г. Ивантеевка, Московская область) по ТУ 9213-928-00419779-07.

Рисунок 1 – Схема проведения эксперимента

Состав сырокопченых колбас: говядина, конина, жир говяжий, соевые гранулы и пряности. Из подмороженного сырья (от –1 °С до –3 °С) готовили фарш (температура готового фарша от 0 °С до –2 °С), затем вносили оставшиеся рецептурные компоненты, включая стартовые культуры в количестве 10^9 КОЕ/г фарша (где это необходимо). После наполнения оболочки фаршем и развешивания батонов на рамах проводилась осадка при температуре 3 °С в течение 5–7 сут. Условия климатизации: 1 цикл – температура 24 °С, влажность 70%, продолжительность 55 ч; 2 цикл – температура 22 °С, влажность 93%, продолжительность 21 ч 20 мин; 3 цикл: созревание 20 ч при температуре 18 °С, влажность 88%, далее созревание 6 ч при температуре 16 °С, влажность 88%. Сушка батонов при температуре 12–14 °С, влажности 84–86 % и скорости потока воздуха 0,05–0,1 м/с.

Для изучения свойств микроорганизмов использовали общепринятый метод культивирования микроорганизмов (1) по ГОСТ ISO 7218, протеолитический тест на разжижение желатина (2) и метод определения протеолитической активности модифицированным методом Ансона (3, 4) по ГОСТ 20264.2. Количество молочнокислой микрофлоры в ферментированной стартовыми культурами мышечной ткани определялось на капустно-меловом агаре с последующим подсчетом количества колоний, вокруг которых образовалась зона просветления, по ГОСТ 10444.1 (8), видовое соответствие штаммов – с помощью микроскопирования по ГОСТ 10444.11 (9).

Для исследования образцов сырокопченых колбас была проведена органолептическая оценка колбас по ГОСТ 9959 (12); гистологическая оценка по ГОСТ 31479 (13); определение жира по ГОСТ 23042 (14); определение белка по ГОСТ 25011 (15); определение нитрита натрия по ГОСТ 8558.1 (16); определение массовой доли влаги по ГОСТ 9793 (17); определение концентрации водородных ионов pH по ГОСТ Р 51478 (18); активность воды по ГОСТ ISO 21807 (19).

ПЦР генов протеиназ (5) проводилась на амплификаторе Eppendorf Mastercycler Gradient («Eppendorf», США) с использованием праймеров в концентрации 1 мкМ; ДНК-электрофорез образцов (6) – в камере для горизонтального электрофореза SE-2 («Helicon», США) в 1% агарозном геле с окраской электрофореграмм бромистым этидием.

Микробиологическая оценка сырокопченых колбас была осуществлена методом T-RFLP (20), основанном на анализе вариабельности консервативных участков генома микроорганизмов, и методом MALDI Biotyper (21), основанном на масс-спектрометрическом исследовании.

T-RFLP-анализ включал следующие стадии: выделение общей ДНК микроорганизмов; ПЦР-амплификация фрагментов генов бактерий (16SрДНК) с флуоресцентномечеными праймерами (обычно с 5'-конца) 63F CAGGCCTAACACATGCAAGTC и 1087R TACGGHTACCTTGTTACGACTT (ООО «Бигль», Россия); ферментативная обработка амплификата с помощью эндонуклеаз рестрикции HaeIII, HhaI и MspI («Fermentas», Литва); разделение

полученных в результате рестрикции фрагментов ДНК в полиакриламидном геле в секвенаторе CEQ 8000 («Beckman Coulter», США) вместе с маркером ДНК известного размера Size Standart-600 («Beckman Coulter», США), меченного флуоресцентным красителем. Определение филогенетической принадлежности микроорганизмов проводили с помощью программ и базы данных FragSort (University of Idaho, США).

В основе технологии прямого бактериального профилирования с помощью MALDI Biotyper на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex («Bruker», Германия) лежит получение воспроизводимого в стандартных условиях профиля белковых масс, который является специфичной характеристикой для данного микроорганизма по типу «отпечатков пальцев». Чашка Петри с 24-часовыми культурами помещается в камеру ионизации масс-спектрометра, где обстреливается ультрафиолетовым азотным лазером с длиной волны 337 нм.

Одномерный электрофорез (22) белкового профиля мясного сырья проводили в 12,5% полиакриламидном геле в камере для вертикального электрофореза («Helicon», США) с последующим окрашиванием электрофореграмм Кумасси R-250 («PanReac», Испания) и анализом изображений с помощью ПК ImageG; двумерный электрофорез (23) белкового профиля мясного сырья и сырокопченых колбас – по О'Фарреллу с использованием камеры («Bio-Rad», США) с помощью изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в стеклянных трубках в первом направлении, электрофорезом в полиакриламидном геле во втором направлении и окрашиванием Кумасси R-250 («PanReac», Испания) или азотнокислым серебром; компьютерную денситометрию (24) двумерных электрофореграмм во влажном состоянии, полных/отдельных фрагментов осуществляли сканированием (Expression 1680, «Epson», США), разрешение 300 ppi, анализ изображений с помощью ПО ImageMaster ™ 2D Platinum на базе Melanie 7.0 («GE Healthcare», Швейцария), при определении количества белка использовалось по 3 электрофореграммы с равным нанесением. Разброс значений оптической плотности составлял не более ±1,5%; биоинформационный анализ 1-ДЭ и 2-ДЭ электрофореграмм (25) – интерпретация белковых фрагментов в соответствии с БД Swiss-Prot и БД протеомики мышечных органов; масс-спектрометрический анализ белковых фракций (26) – с использованием оборудования ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН: полученные пептиды идентифицировали методами MALDI-TOF и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex («Bruker», Германия) с УФ-лазером (λ = 336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да. Анализ масс-спектров с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США) (точность определения массы MH+ 0,01%) с использованием базы данных Protein NCBI; масс-спектрометрический анализ спектров коротких

пептидов (27) с m/z 1500–4500 осуществляли следующим образом: 100 мг образца гомогенизировалось в 2 мл фосфатного буфера, гомогенат осветлялся центрифугированием при 800 g в течение 5 мин и использовался для получения спектра пептидов. Экстракцию коротких пептидов из образцов сырокопченой колбасы осуществляли в бидистиллированной воде; биоинформационный анализ пептидов (28) – идентификация и прогнозирование биологической активности пептидов с помощью баз данных NCBI, ToxinPred, AntiCP и AntiBP.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Протеолитическая активность у микроорганизмов была определена стандартным тестом на разжижение желатина, а также методом Ансона их лизатов, так как БАП могут быть получены, в том числе, из субстратных белков под действием внутримембранных протеаз (Venegas-Ortega M.G. и др., 2019).

В **разделе 3.1** установлено, что наибольшим протеолитическим потенциалом (внутриклеточная протеолитическая активность > 60 ед. ПС/мл, что условно принято как минимум активности, исходя из среднеарифметического) обладали штаммы *P. acidilactici* 38, *P. acidilactici* 28, *S. carnosus* 108, *L. acidophilus* 45, *L. sakei* 105, *L. curvatus* 1, *P. pentosaceus* 106, *L. curvatus* 2 и *L. plantarum* 22/2 (табл. 1).

Таблица 1 – Определение протеолитической активности стартовых культур качественным и количественным методами

№ п/п	Наименование штамма	Тест на разжижение желатина	Внутриклеточная протеолитическая активность, ед. ПА/мл (по Ансону)
1	*P. acidilactici* 38	++++	78,02±0,08[a]
2	*P. acidilactici* 28	+++	72,17±0,07[a]
3	*S. carnosus* 108	++++	104,43±0,53[b]
4	*L. acidophilus* 45	++++	67,05±0,44[a]
5	*L. sakei* 103	–	51,68±0,63[c]
6	*S. carnosus* 301-2	–	40,54±0,61[a,c]
7	*L. curvatus* 1	+++	91,30±0,33[b]
8	*P. pentosaceus* 106	++	62,22±0,43[c]
9	*S. xylosus* 96	–	49,36±0,17[c,d]
10	*L. casei* 10	–	51,40±0,37[c]
11	*P. pentosaceus* 55	–	44,67±0,49[d]
12	*L. curvatus* 2	++	72,21±0,22[a,d]
13	*L. sakei* 105	++	65,15±0,53[c]
14	*L. sakei* 104	–	53,10±0,32[c]
15	*L. plantarum* 22/2	++	65,41±0,55[a]
16	*P. pentosaceus* 27	+	49,18±0,89[c]

Примечания: «++++» – значительное разжижение, «+++» – хорошее разложение, «++» – удовлетворительное разложение, «+» – слабое разжижение, «–» – разжижение отсутствует; a–d – различия в пределах столбца статистически значимы при $p < 0,05$.

При молекулярно-генетическом исследовании генов протеиназ была обнаружена пара генов PrtP100/PrtM700 (685 п.н.) у штаммов *L. casei* 10, *L. curvatus* 1 и *L. sakei* 105. У штаммов *L. acidilactici* 45 и *L. casei* 10 была обнаружена пара генов PRTB10/PRTB20 (597 п.н.). Для штаммов *P. acidilactici* 38, *P. acidilactici* 28, *L. acidilactici* 45 и *L. casei* 10 было характерно наличие пары генов протеолитической активности Jp23/Jp25 (1034 п.н.). Пары генов P15C/P06C (560 п.н.) и prti2/IP6Xba (1052 п.н.) были представлены во многих анализируемых штаммах. Так, пара P15C/P06C была обнаружена у *P. acidilactici* 38, *P. acidilactici* 28, *L. sakei* 103, *L. curvatus* 1 и *L. curvatus* 2, а пара prti2/IP6Xba у *S. carnosus* 108, *L. acidilactici* 45, *L. curvatus* 1 и *P. pentosaceus* 106 (рис. 2).

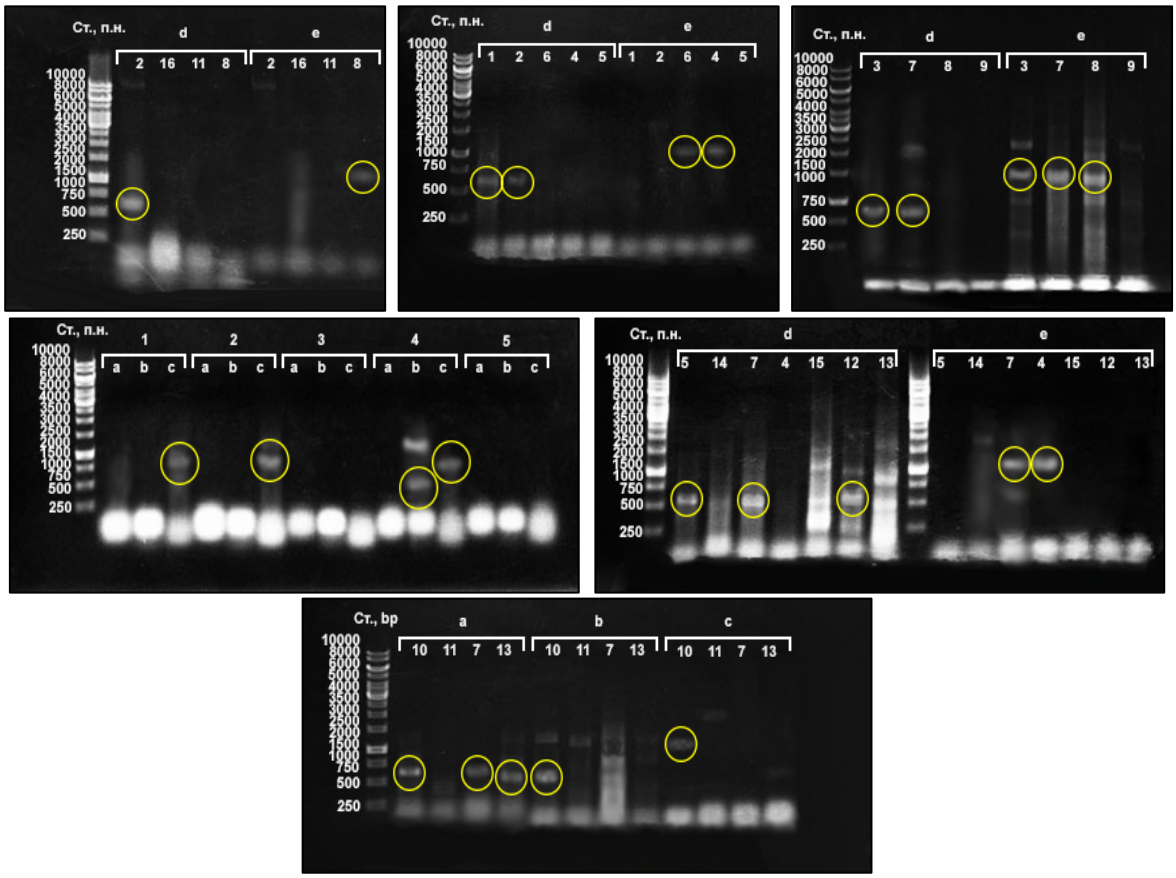

Рисунок 2 – ДНК-электрофорез исследуемых штаммов стартовых культур
Условные обозначения: a – пара генов PrtP100/PrtM700 (685 п.н.), b – PRTB10/PRTB20 (597 п.н.), c – Jp23/Jp25 (1034 п.н.), d – P15C/P06C (560 п.н.), e – prti2/IP6Xba (1052 п.н.); 1 – *P. acidilactici* 38, 2 – *P. acidilactici* 28, 3 – *S. carnosus* 108, 4 – *L. acidophilus* 45, 5 – *L. sakei* 103, 6 – *S. carnosus* 301–2, 7 – *L. curvatus* 1, 8 – *P. pentosaceus* 106, 9 – *S. xylosus* 96, 10 – *L. casei* 10, 11 – *P. pentosaceus* 55, 12 – *L. curvatus* 2, 13 – *L. sakei* 105, 14 – *L. sakei* 104, 15 – *L. plantarum* 22/2, 16 – *P. pentosaceus* 27

В **разделе 3.2** представлены результаты микробиологической оценки табл. 2) и протеомного исследования мышечной ткани КРС, ферментированной бактериями *P. pentosaceus* 106, *P. acidilactici* 38, *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 1, выбранными как наиболее протеолитические по

совокупности измеренной протеолитической активности и наличия наибольшего количества генов протеолитической активности.

Определение количества молочнокислых бактерий (МКБ) показало стабильное развитие в мышечной ткани стартовых культур, а результаты микроскопии подтвердили видовое соответствие внесенных штаммов.

Таблица 2 – Результаты микробиологической оценки ферментированных образцов мышечной ткани

Показатель	Контроль	Образец с *P. pentoseceus* 106	Образец с *P. acidilactici* 38	Образец с *L. sakei* 105	Образец с *L. curvatus* 1
Количество МКБ, КОЕ/г	$1{,}4\times10^2$	$5{,}6\times10^6$	$2{,}7\times10^4$	$6{,}4\times10^5$	$4{,}5\times10^5$
Картина микроскопирования	Единичные клетки различной формы	Кокки, расположены в виде тетрад	Кокки, расположены в виде тетрад	Палочки с закругленными концами	Коккобациллы, расположенные в парах в форме кофейного зерна

Согласно результатам одномерного электрофореза (1-ДЭ) все штаммы способствовали формированию фрагментов тяжелой цепи миозина, а также деструкции белковых фрагментов в области нахождения десмина и эластина (количественное уменьшение белковых фракций на 48–52 % и 65–87 %, соответственно). Под действием штаммов *P. acidilactici* 38 и *L. curvatus* 1 происходила деструкция α-актина – уменьшение на 96% и 95% соответственно. Штаммы *P. acidilactici* 38, *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 1 оказывали существенное деструктивное влияние на фрагменты тропонина Т (уменьшение на 75, 77 и 49 % соответственно) и легкой цепи миозина 1/3 (уменьшение на 88, 99 и 100 % соответственно).

Влияние стартовых культур на мышечную ткань *l. dorsi* говядины методом 2-ДЭ показано на рис. 3 (стрелками указаны идентифицированные полипептиды, представленные в табл. 3). Их воздействие приводило к количественному уменьшению основных мышечных белков в пределах от 19 до 40 % в сравнении с контрольным образцом (рис. 4). Следует отметить, что деструктивный эффект был более выражен у рода *Pediococcus*, что позволяет рассматривать данный род бактерий как более перспективный для промышленных технологий.

Наблюдалось наличие некоторых треков мажорных белков и продуктов их деградации – митохондриальной аконитазы 2, мышечной креатинфосфаткиназы и енолазы, изменения степени экстрагируемости альбумина, разной степени утилизации скелетномышечной легкой цепи миозина 1/3 (особенно у штамма *L. sakei* 105) и во всех случаях как признак разрушения актомиозинового комплекса появлялись фрагменты тяжелой цепи миозина С-конца.

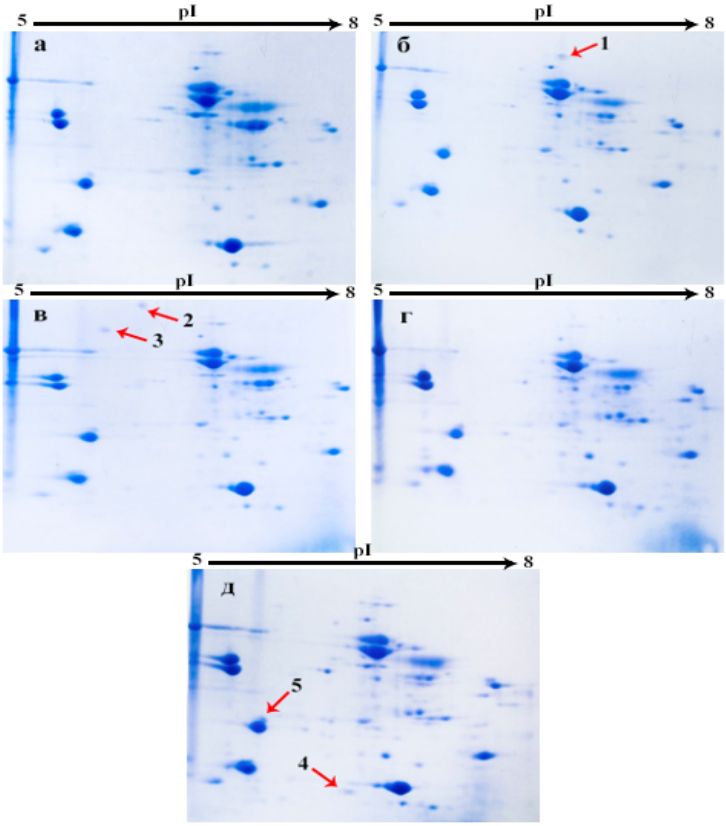

Рисунок 3 – 2-ДЭ образцов ферментированной *l. dorsi* говядины
Условные обозначения: а – контроль, б – образец, ферментированный *P. pentosaceus* 106, в – *P. acidilactici* 38, г – *L. sakei* 105, д – *L. curvatus* 1. Стрелками указаны идентифицированные полипептиды. Окрашивание Кумасси R-250.

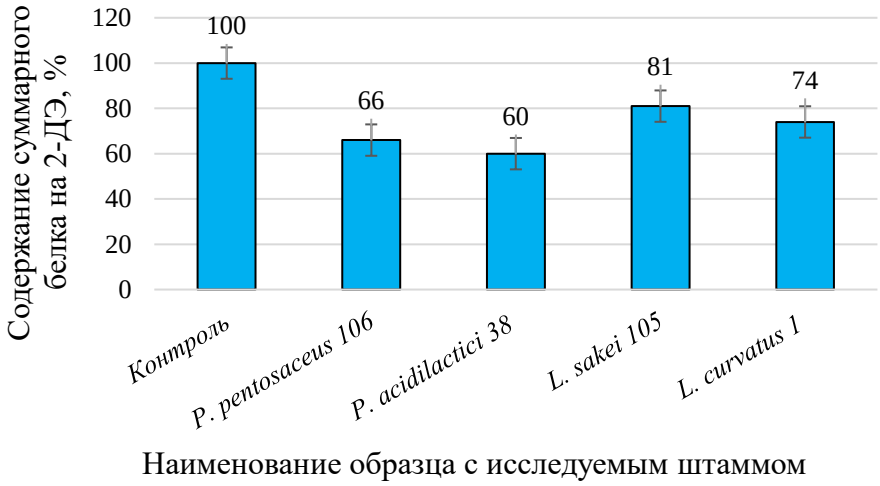

Рисунок 4 – Денситометрическая характеристика изменения количественного содержания суммарного белка на 2-ДЭ исследуемых образцов говядины, ферментированных соответствующей стартовой культурой. Разброс значений оптической плотности составлял не более ±1,5%.

Более специфичным являлось действие *P. pentosaceus* 106 и *P. acidilactici* 38, что проявлялось в более полном протеолизе мажорных белков по сравнению с *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 1. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) белковых фракций, проявляющих изменения на 2-ДЭ белков после обработки стартовыми культурами

№	Наименование белковых фрагментов	Номера в Protein NCBI	S / M/ C *	Мм/pI (эксп.)	Мм/pI (расчет.)
P. pentosaceus 106					
1	Фрагмент аконитазы 2, митохондриальной	AAI02643.1	124/32/46	57,0/5,90	85,2/8,08
P. acidilactici 38					
2	Фрагмент сывороточного альбумина	NP 851335.1	277/34/48	65,0/5,70	69,3/5,82
3	Фрагмент миозина-1	NP 776542.1	307/58/30	57,0/4,90	223,0/5,957
L. curvatus 1					
4	Фрагмент С-конца глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы	NP 001029206.1	136/3/19	14,5/6,40	35,8/8,50
5	Фрагмент миозиновой легкой цепи 1/3, скелетномышечной изоформы	NP 001073046.1	146/31/81	21,0/5,00	20,9/4,96

Масс-спектрометрическое исследование образцов мышечной ткани говядины, обработанных стартовыми культурами, выявило некоторые различия в области образования коротких пептидов (рис. 5, пунктирной линией обозначены идентифицированные пептиды в соответствии с табл. 3). Штамм *P. acidilactici* 38 практически не образовывал короткие пептиды, а при использовании *P. pentosaceus* 106 и *L. curvatus* 1 их количество увеличивалось. Наибольшую способность формировать широкий спектр пептидов показала культура *L. sakei* 105. Удалось идентифицировать 4 пептида (табл. 4), которые относятся к семейству тропонина Т быстрого типа и скелетномышечного актина (данный пептид образовался под действием культур *P. acidilactici* 38, *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 1).

В целом, штамм *L. sakei* 105 стабильно образовывали большее количество разнообразных пептидов в широком диапазоне масс в отличие от остальных штаммов. Снижение доли коротких пептидов в исследованных образцах наблюдалось в следующей последовательности: *L. sakei* 105 > *P. pentosaceus* 106 > *L. curvatus* 1 > *P. acidilactici* 38. Выделенные пептиды являются гомологами триптических пептидов.

В **разделе 3.3** на основании результатов молекулярно-генетического анализа генов протеиназ, данных исследования протеолитической активности и результатов протеомного исследования ферментированной мышечной ткани КРС были отобраны перспективные в отношении протеолиза штаммы, разработан бактериальный препарат «ФермБиакт» и нормативная документация на него (проект ТУ и ТИ).

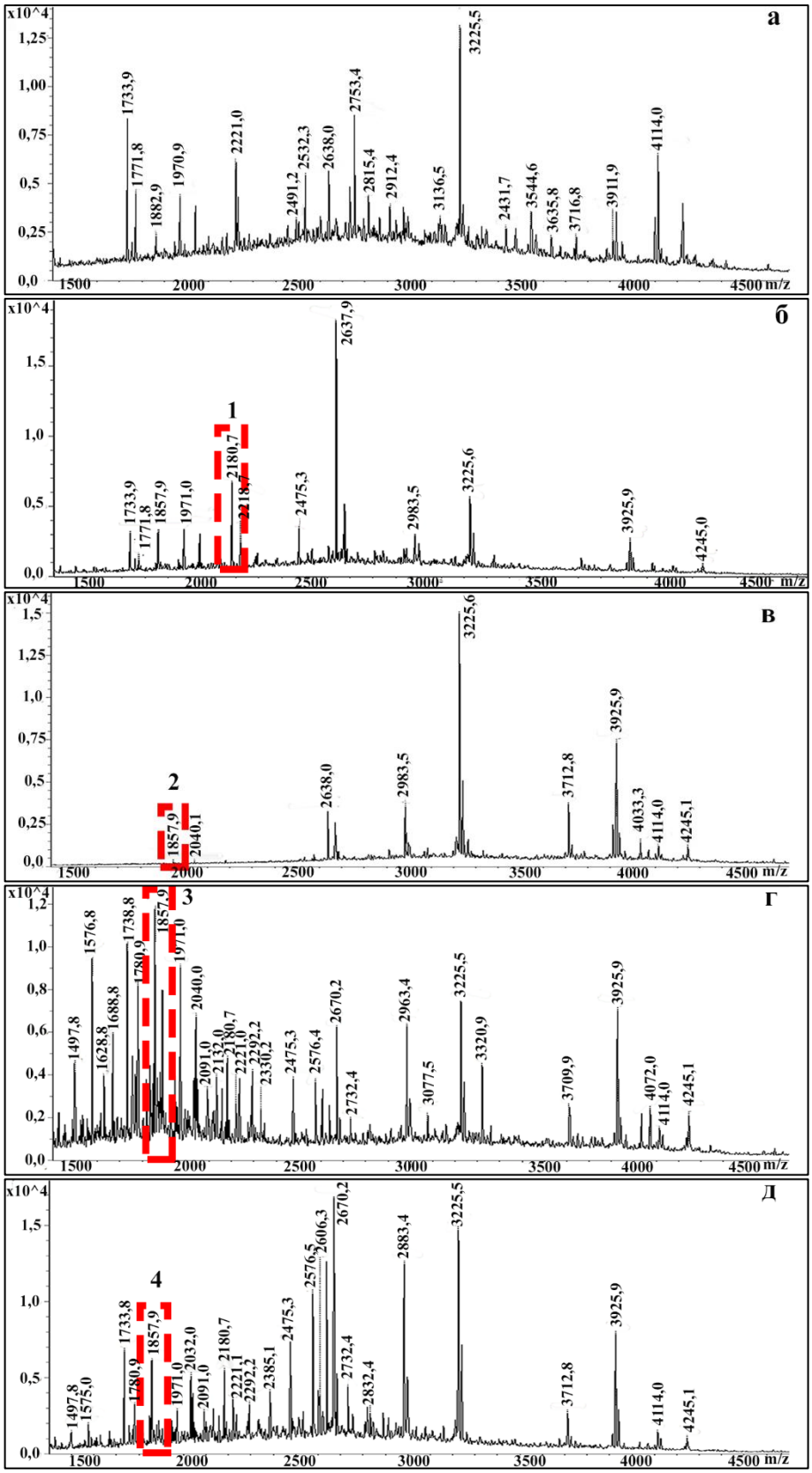

Рисунок 5 – Исследование спектра коротких пептидов (m/z 1500–4500) в образцах мясного сырья после обработки стартовыми культурами

Условные обозначения: а – контроль, б – образец, ферментированный *P. pentosaceus* 106, в – *P. acidilactici* 38, г – *L. sakei* 105, д – *L. curvatus* 1.

Таблица 4 – Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) коротких пептидов (m/z 1500–4500) белковых фракций после обработки стартовыми культурами

№	Наименование белка-предшественника	Номера в Protein NCBI	S / M/ C	m/z (позиция в а.п.)	Последовательность пептида
P. pentosaceus 106					
1	Тропонин Т, быстрый скелетномыш.	XP 010819502.1	58/8/45	2180.7 (2–18)	SDEEVEHVEEEYEEEEE
P. acidilactici 38					
2	α-актин, скелетномыш.	NP 776650.1	45/10/38	1857.9 (360–375)	TKQEYDEAGPSIVHRK
L. sakei 105					
3	α-актин, скелетномыш.	NP 776650.1	45/7/24	1857.9 (360–375)	TKQEYDEAGPSIVHRK
L. curvatus 1					
4	α-актин, скелетномыш.	NP 776650.1	45/7/27	1857.9 (360–375)	(TKQEYDEAGPSIVHRK)

Композиция включала в себя штаммы *P. acidilactici* 38 и *L. curvatus* 1, а также штамм *S. carnosus* 108, обладающий денитрифицирующими свойствами. Внесение в бактериальные композиции денитрифицирующих стафилококков позволяет снизить риски, связанные с применением нитрита натрия, а также улучшить цветовые и вкусо-ароматические характеристики готового продукта (Лаптев И.А. и соавт., 2008). Методом перпендикулярных штрихов антагонизма между штаммами выявлено не было.

Для сравнения были взяты образцы сырокопченых колбас, выработанных без использования стартовых культур (БСК) и с импортным бактериальным препаратом Bactoferm SM 194 компании Christian Hansen (СКХХ), состоящим из штаммов *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, *Latilactobacillus sakei* и *Debaryomyces hansenii*.

Готовые сырокопченые колбасы были оценены по органолептическим показателям: внешний вид, консистенция, вид на разрезе, цвет и запах. Исследуемые образцы были приятной розовой окраски, без посторонних привкуса и запаха. Опытные образцы имели небольшую приятную кислинку за счет молочной кислоты, синтезируемой стартовыми культурами. Органолептические показатели образцов соответствовали данному виду продукции по ГОСТ Р 55456.

Для сырокопченых колбас была проведена оценка таких физико-химических показателей как содержание жира, белка, нитрита натрия, влаги, водородного показателя pH и показателя активности воды a_w (табл. 5). Согласно полученным результатам, физико-химические показатели образцов соответствовали сухим сырокопченым колбасам по ГОСТ 33708. Значения

pH и a_w, не позволяет развиваться микрофлоре порчи (Рогов И.А. и др., 2010). Снижение активности воды, сопровождающее процесс созревания колбасы, оказывает лишь ограниченное влияние на жизнеспособность и выживаемость стартовых культур (Janben D. и др., 2018), о чем свидетельствовали данные микробиологических исследований.

В результате анализа T-RFLP установлено, что во всех образцах присутствовали лактобактерии различных видов. Максимальное количество выявлено в образце СКК (69,6%), а в образцах БСК и СКХХ – 66,4 и 57,9 % соответственно. При использовании метода MALDI в образце БСК были идентифицированы бактерии *Lactiplantibacillus plantarum, Levilactobacillus brevis, Enterococcus faecium* и *Staphylococcus saprophyticus*, в образце СКК – *Levilactobacillus curvatus, Pediococcus pentosaceus, Lactiplantibacillus plantarum* и *Enterococcus hirai*, а в образце СКХХ – *Levilactobacillus sakei, Pediococcus pentosaceus, Staphylococcus carnosus, Lactiplantibacillus plantarum* и *Levilactobacillus brevis*, что подтверждает развитие в колбасах стартовых культур на этапе технологического процесса. Ни в одном образце не было обнаружено патогенной и санитарно-показательной микрофлоры, что соответствует требованиям ТР ТС 034/2013 и ТР ТС 021/2011.

Таблица 5 – Физико-химических показатели образцов сырокопченых колбас

Показатель	Образец		
	БСК	СКК	СКХХ
Массовая доля жира, %	$51{,}42\pm0{,}77^{a,*}$	$52{,}01\pm0{,}78^{a}$	$51{,}90\pm0{,}78^{b}$
Массовая доля белок, %	$17{,}34\pm0{,}26^{b}$	$18{,}52\pm0{,}28^{b,*}$	$17{,}98\pm0{,}27^{b}$
Массовая доля нитрита натрия, %	$0{,}003\pm0{,}00003^{c}$	$0{,}001\pm0{,}00003^{c}$	$0{,}001\pm0{,}00003^{c}$
Массовая доля влаги, %	$32{,}85\pm0{,}42^{b,*}$	$32{,}47\pm0{,}49^{a}$	$34{,}72\pm0{,}52^{a,b}$
Водородный показатель (pH)	$5{,}51\pm0{,}08^{d}$	$4{,}92\pm0{,}07^{b}$	$5{,}05\pm0{,}08^{b}$
Активность воды (a_w)	$0{,}88\pm0{,}012^{d}$	$0{,}81\pm0{,}011^{b}$	$0{,}84\pm0{,}012^{b}$

Примечания: a–d – различия в пределах одного столбца статистически значимы при $p < 0{,}05$; * – различия между столбцами статистически значимы при $p < 0{,}05$.

Гистологическое исследование образцов сырокопченых колбас показало, что структура образца БСК характеризовалась плотной компоновкой структурных элементов фарша, мелкозернистой белковой массой с жировыми включениями и свободнолежащими по отношению друг к другу гомогенными и частично слившимися мышечными волокнами в глубоких слоях. Структура образца СКК отличалась меньшей компактностью и большими деструктивными изменениями мышечных волокон, масса фарша была пронизана микрокапиллярами, местами сливающимися друг с другом, микрофлора бактериального препарата располагалась в виде множественных крупных микроколоний в мелкозернистой белковой массе. Аналогичная ситуация наблюдалась в структуре образца СКХХ, однако этот образец характеризовался более плотной компоновкой по сравнению с образцом СКК.

Анализ протеома образцов сырокопченых колбас показал, что совместное применение бактерий родов *Pediococcus*, *Lactobacillus* и *Staphylococcus* способствовало более полной деструкции всех мышечных белков по сравнению с применением бактерий по-отдельности. В свою очередь, это приводит к улучшению органолептических и функциональных свойств мясных продуктов, что подтверждается данными других ученых (Lopez C.M. и др., 2015).

Результаты протеомного исследования образцов сырокопченых колбас показали (рис. 6, стрелками и кругами указаны идентифицированные пептиды в соответствии с табл. 5) определенные отличия белкового спектра. Эффект воздействия бактериальной композиции СКК в основном сказался на образовании N- и C-концевых фрагментов тяжелых и легких цепей миозина (фракции № 1 и 3). Актомиозиновый комплекс разрушался медленнее в этом образце по сравнению с образцом, ферментированным коммерческой композицией СКХХ, но ряд тканевых ферментов, таких как мышечная пируватдегидрогеназа E1 (фракция № 2), креатинфосфаткиназа (КФК) (фракция № 12) и енолаза, альдолаза А и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (Г3ФД) (фракция № 5) распадались активнее. На 2-ДЭ исследуемых контрольных образцов, выработанных без использования стартовых культур (БСК), стабильно присутствовали фрагменты С-концевой части миоглобина (фракции № 9 и 10), однако в ферментированных образцах у этих фрагментов был существенно размыт контур, что говорит об отщеплении от 1 до 5 аминокислотных остатков их концевых частей.

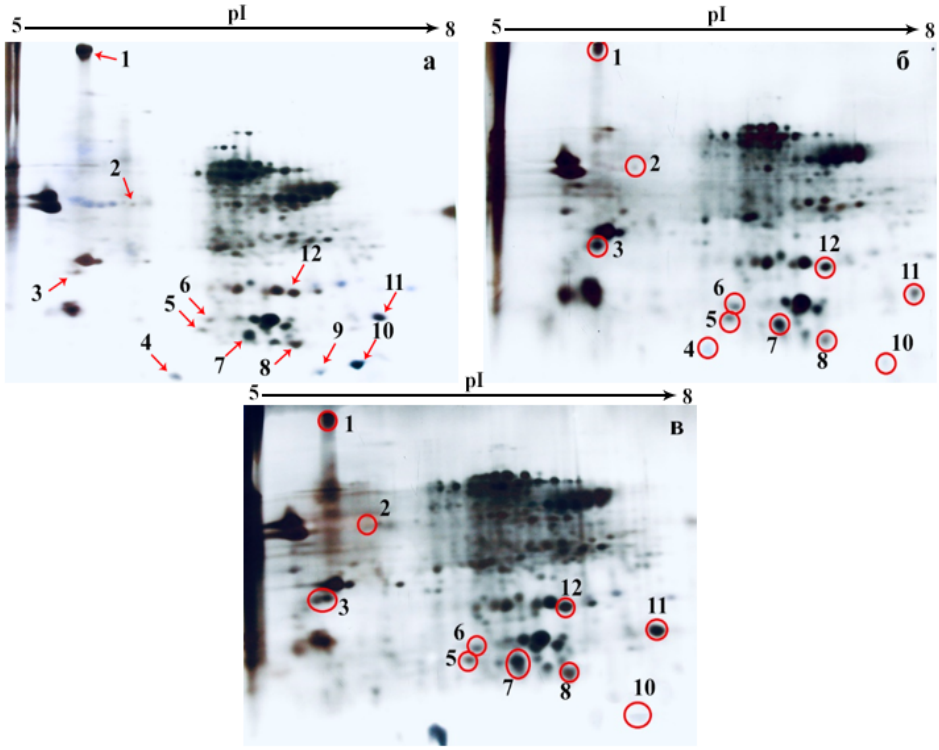

Рисунок 6 – 2-ДЭ образцов сырокопченых колбас
Условные обозначения: а – контроль, б – обработка композицией СКК, в – обработка композицией СКХХ. Окрашивание азотнокислым серебром.

Как видно из рис. 7 (пунктирной линией обозначен пептид, идентифицированный в соответсвтии с табл. 6), удалось получить широкий диапазон пиков масс пептидов в исследованных образцах. Контрольный образец давал наиболее широкий спектр по массам и с большим количеством пиков масс. Применение композиции СКК уменьшало разброс масс-спектров, особенно в области масс m/z более 2500, что было еще более выражено при применении композиции СКХХ. Пептидов, отличных от контроля, в спектрах обнаружено мало. Был получен один спектр фрагментации водорастворимого пептида массой m/z 1667,8 для образца с композицией СКК, который соответствует пептиду миоглобина (табл. 7), образовавшегося не по триптическому пути расщепления.

Таблица 6 – Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) белковых фракций, проявляющих изменения на 2-ДЭ белков образцов сырокопченой колбасы

№	Наименование белка-предшественника	Номера в Protein NCBI	S / M/ C *	Мм/pI (эксп.)	Мм/pI (расчет.)
1	Фрагмент (215–1922) миозина-1	NP 776542.1	391/74/35	170,0/5,10	222,8/5,57
2	Смесь фрагментов (45–291) глицинина суб. A1aB1b и (53–324) пируватдегидрогеназы E1 β-субъединицы, митохондр.	ACT53400.1 NP 001030512.2	117/10/47 149/9/27	30,0/5,50	43,5/5,51 39,1/6,21
3	Смесь фрагментов (9–187) легкой цепи миозина 1/3, скелетномышечная изоформа	NP 001073046.1	50/20/74	21,0/4,95	20,9/4,96
4	Фрагмент (2–43) миоглобина	NP 776306.1	130/7/27	8,5/5,80	17,1/6,90
5	Смесь фрагментов глицинина G1, (233–321) глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и (48–62) легкой цепи миозина 1/3, скелетномышечная изоформа	KNP10744.1 NP 001029206.1 NP 001073046.1	112/4/14 129/3/19 62/2/7	15,0/6,00	55,8/5,95 35,8/8,50 20,9/4,96
6	Смесь фрагментов (181–436) глицинина G1 и скелетномышечного α-актина	KNP10744.1 AAI134666.1	109/6/21 69/11/35	16,0/6,10	55,8/5,95 42,0/5,23
7	Фрагмент (2–119) миоглобина	NP 776306.1	70/10/38	13,5/6,90	17,1/6,90
8	Смесь фрагментов (9–78) легкой цепи миозина 1/3, скелетномышечная изоформа и (115–336) гладкомышечного γ-актина	NP 001073046.1 DAA24846.1	126/5/27 67/20/	12,5/7,15	21,0/4,96 39,7/5,22
9	Фрагмент (98–148) миоглобина	NP 776306.1	108/7/33	9,0/7,30	17,1/6,90
1	Фрагмент (98–148) миоглобина	NP 776306.1	77/8/33	9,5/8,00	17,1/6,90
11	Фрагмент (301–531) глицинина и (20–138) тропонина I, быстрого скелетномыш.	CAA37044.1 NP 001179023.1	119/8/17 88/11/48	16,0/8,50	63,8/5,21 21,4/8,88
12	Смесь фрагментов (398–531) глицинина и (210–381) креатинфосфаткиназы М-типа	CAA37044.1 NP 777198.2	103/4/10 112/16/35	20,2/7,10	63,8/5,21 43,0/6,63

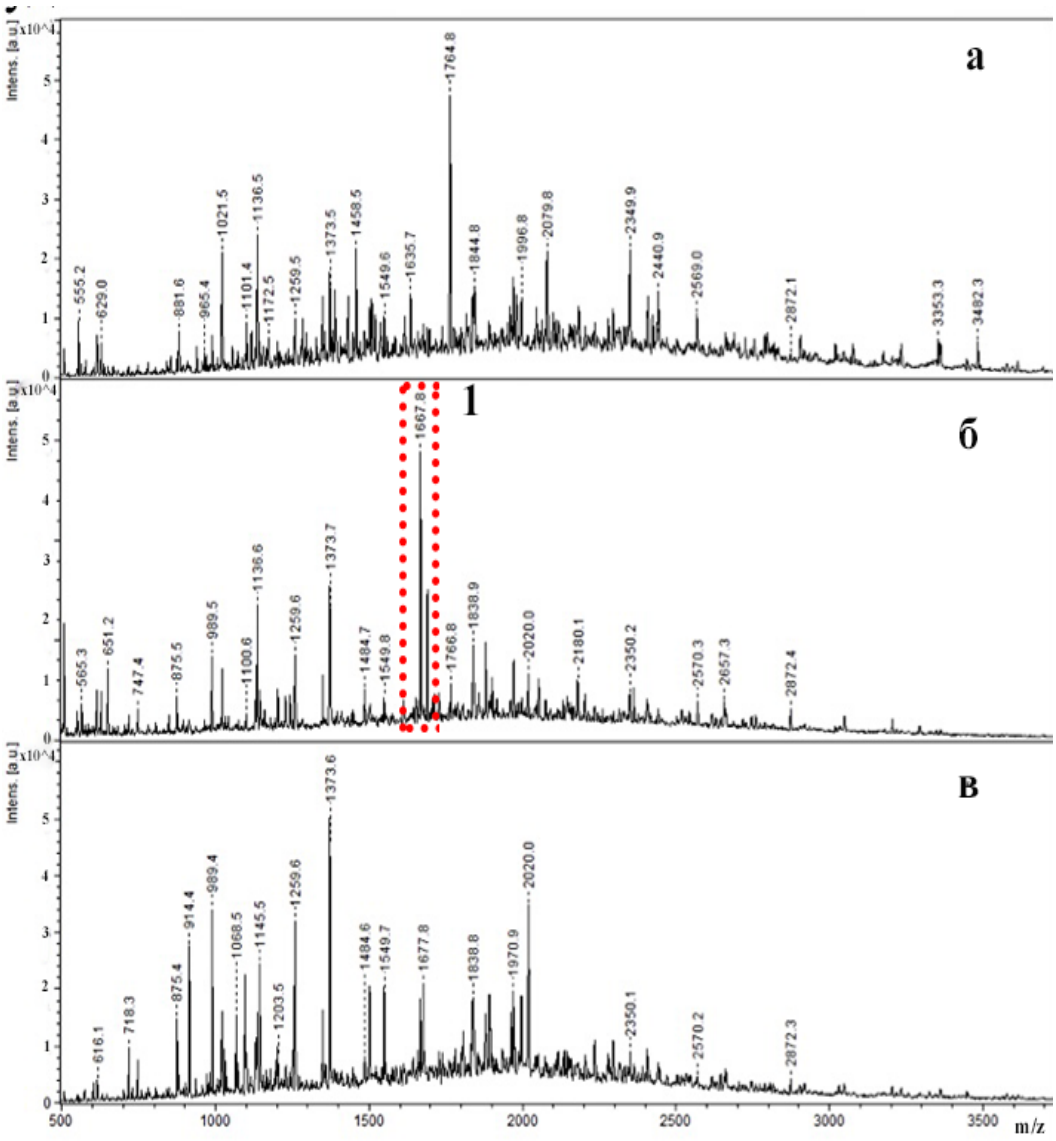

Рисунок 7 – Исследование спектра коротких пептидов (m/z 1500–3500) образцов сырокопченой колбасы. Условные обозначения: а – контроль, б – с обработкой композицией СКК, в – с обработкой композицией СКХХ.

Таблица 7 – Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) коротких пептидов (m/z 1500–3500) белковых фракций после обработки разработанной композицией стартовых культур

№/№	Наименование белка-предшественника	Номера в Protein NCBI	S / M/ C *	m/z (позиция в а.п.)	Последовательность пептида *
1	Миоглобин	NP 776306.1	52/15/48	1667.8 (13–27)	NAWGKVEADVAGHGQ

В **разделе 3.4** была оценена возможность наличия потенциальной специфической биологической активности у полученных пептидов с применением методов биоинформатики. В результате масс-спектрометрического исследования фрагментов, полученных из образцов мышечной ткани *l. dorsi* КРС, ферментированной стартовыми культурами, и

образцов сырокопченых колбас, ферментированных разработанным бактериальным препаратом, с применением базы данных NCBI (табл. 8) были идентифицированы следующие пептиды: SDEEVEHVEEEYEEEEE, TKQEYDEAGPSIVHRK и NAWGKVEADVAGHGQ.

Таблица 8 – Результаты идентификации пептидов с помощью базы данных NCBI

№	Пептид	Белок-предшественник	Позиция пептида в белке-предшественнике
1	SDEEVEHVEEEYEEEEE	Тропонин Т (*Bos taurus*)	47–63
2	TKQEYDEAGPSIVHRK	α-актин (*Bos taurus*)	360–375
3	NAWGKVEADVAGHGQ	Миоглобин (*Bos taurus*)	13–27

Согласно результатам биоинформатического анализа полученные пептиды являлись нетоксичными (рис. 8). База данных ToxinPred также позволила оценить основные физико-химические показатели пептидов, такие как гидрофобность, гидрофильность, гидропатичность, заряд и молекулярную массу.

Query Peptides

Peptide ID	Peptide Sequence	SVM Score	Prediction	Hydrophobicity	Hydropathicity	Hydrophilicity	Charge	Mol wt
seq1	SDEEVEHVEEEYEEEEE	-0.63	Non-Toxin	-0.42	-2.29	1.79	-11.50	2139.27
seq2	TKQEYDEAGPSIVHRK	-0.77	Non-Toxin	-0.36	-1.49	0.72	0.50	1858.27
seq3	NAWGKVEADVAGHGQ	-0.98	Non-Toxin	-0.10	-0.63	0.07	-0.50	1538.86

1/1 50

Рисунок 8 – Результаты прогнозирования с помощью базы данных ToxinPred

При прогнозировании противоопухолевой биологической активности с помощью базы данных AntiCP было выявлено наличие данной активности у всех исследуемых пептидов (рис. 9).

ID	Seq	Score	Prediction	Hydrophobicity	Hydropathicity	Hydrophilicity	Charge	pI	Mol wt
seq1	SDEEVEHVEEEYEEEEE	0.7	AntiCP	-0.42	-2.29	1.79	-11.50	3.56	2139.27
seq2	TKQEYDEAGPSIVHRK	0.52	AntiCP	-0.36	-1.49	0.72	0.50	7.10	1858.27
seq3	NAWGKVEADVAGHGQ	0.48	AntiCP	-0.10	-0.63	0.07	-0.50	5.33	1538.86

Рисунок 9 – Результаты прогнозирования с помощью базы данных AntiCP

В базе данных AntiBP была спрогнозирована антибактериальная активность для пептида NAWGKVEADVAGHGQ, полученного из образца сырокопченой колбасы, при производстве которого использовался разработанный бактериальный препарат (рис. 10).

Полученные данные подтверждают результаты других ученых – антимикробные пептиды представляют собой небольшие молекулы с широким спектром антибиотической активности против бактерий, дрожжей, грибов и вирусов и цитотоксической активностью в отношении раковых клеток, в дополнение к противовоспалительной и иммуномодулирующей

активности (Hee-Kyoung K. и др., 2017). Поэтому антимикробные пептиды вызывают интерес и как новые терапевтические агенты, в т.ч. в составе мясных продуктов, требующие дальнейших клинических исследований, и как природные биоконсерванты. Природные противоопухолевые пептиды – новый источник химиотерапевтических средств, которые проявляют клиническую противоопухолевую активность широкого спектра действия (Xin L. и др., 2021).

PEPTIDE	SDEEVEHVEEEYEEEEE
START POSITION	1
SCORE	-0.168
Antibacterial Activiy	NO
CLASS	NO
SUB-FAMILY	NO

PEPTIDE	TKQEYDEAGPSIVHRK
START POSITION	1
SCORE	-1.570
Antibacterial Activiy	NO
CLASS	NO
SUB-FAMILY	NO

PEPTIDE	NAWGKVEADVAGHGQ
START POSITION	1
SCORE	0.121
Antibacterial Activiy	YES
CLASS	Bacteria
SUB-FAMILY	

Рисунок 10 – Результаты прогнозирования с помощью базы данных AntiBP

В **разделе 3.5** представлена схема направленного отбора стартовых культур, способствующих формированию биологически активных пептидов в мясном сырье и готовых мясных продуктах (рис. 11).

Данная схема позволит отбирать как коллекционные стартовые культуры, так и вновь выделенные штаммы, на основе оценки их протеолитического потенциала путем молекулярно-генетического исследования генов протеолитической активности, биохимической оценки протеолитической активности, а также протеомных исследований белкового профиля ферментированного мясного сырья и готовых мясных продуктов.

В **разделе 3.6** представлено обоснование целесообразности применения разработанного бактериального препарата. В последнее десятилетие внутреннее производство всех бактериальных препаратов для пищевой промышленности по отношению к импорту не превышало 10%. В натуральном выражении объем выпуска колебался в пределах 50−60 т (учитывая закваски и концентраты в сухой, жидкой и замороженной форме). В условиях экономических санкций, с которыми в настоящее время столкнулось наше государство, импортозамещение является первоочередной задачей. Разработанный бактериальный препарат «ФермБиакт» эффективен для производства ферментированных колбас, т.к. позволяет получить мясные продукты с заданным комплексом качественных характеристик и гарантированным уровнем безопасности, а также не имеет мировых аналогов, т.к. направлен на образование биологически активных пептидов. Бактериальный препарат рекомендуется к использованию как в новых разработанных технологиях, так и в традиционных технологиях ферментированных колбас, не требующих изменений.

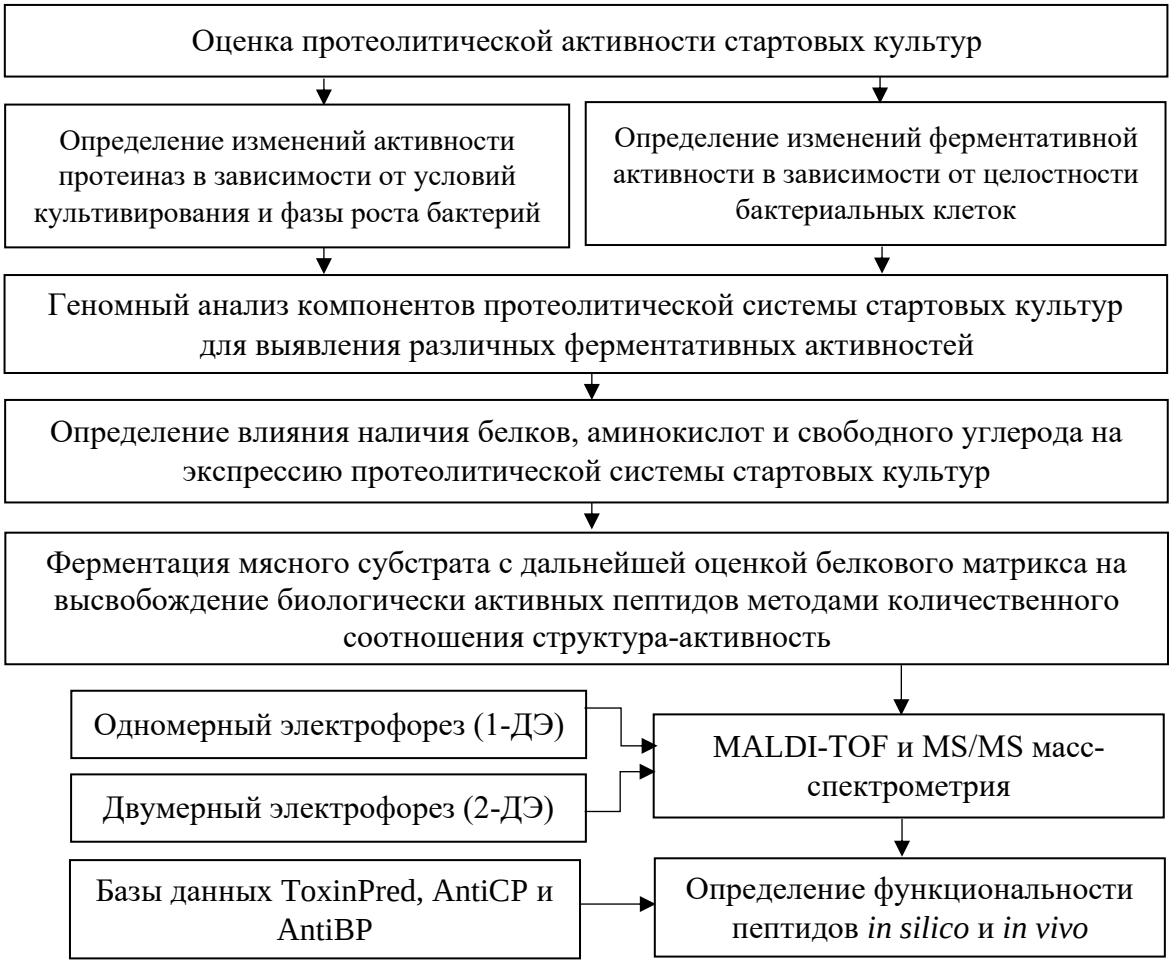

Рисунок 11 – Схема направленного отбора стартовых культур, образующих БАП в мясном сырье и готовых мясных продуктах

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что среди исследуемых в работе стартовых культур наибольшей протеолитической активностью обладали штаммы *P. acidilactici* 38, *P. acidilactici* 28, *S. carnosus* 108, *L. acidophilus* 45, *L. curvatus* 1, *P. pentosaceus* 106, *L. sakei* 105, *L. curvatus* 2 и *L. plantarum* 22/2. Определено наличие генов протеиназ семейства PrtP: пара генов PrtP100/PrtM700 у штаммов *L. casei* 10, *L. curvatus* 1 и *L. sakei* 105, PRTB10/PRTB20 у штаммов *L. acidilactici* 45 и *L. casei* 10, Jp23/Jp25 у штаммов *P. acidilactici* 38, *P. acidilactici* 28, *L. acidilactici* 45 и *L. casei* 10, P15C/P06C у штаммов *P. acidilactici* 38, *P. acidilactici* 28, *L. sakei* 103, *L. curvatus* 1 и *L. curvatus* 2, prti2/IP6Xba у *S. carnosus* 108, *L. acidilactici* 45, *L. curvatus* 1 и *P. pentosaceus* 106. По совокупности наибольшей протеолитической активности и наличия генов протеиназ для дальнейшего изучения влияния стартовых культур на мышечную ткань *l. dorsi* КРС были отобраны штаммы *P. pentosaceus* 106, *P. acidilactici* 38, *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 1.

2. Протеомное исследование образцов ферментированной мышечной ткани методом 1-ДЭ показало деструктивные изменения в таких мажорных белках как десмин и эластин (во всех случаях), α-актин (особенно в случае с *P. acidilactici* 38 и *L. curvatus* 1), легкие цепи миозина 1/3 и тропонин Т (особенно в случае с *P. acidilactici* 38, *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 1). Проведение 2-ДЭ образцов показало, что штаммы *P. pentosaceus* 106 и *P. acidilactici* 38 проявляли наиболее явный деструктивный эффект, что было подтверждено результатами денситометрии (66 и 60 % от исходного процента мажорных белков). Существенным изменениям подверглись мажорные тканевые ферменты – митохондриальная аконитаза 2, креатинфосфаткиназа и енолаза. Штамм *L. sakei* 105 наиболее интенсивно деструктурировал легкую цепь миозина 1/3. Во всех случаях формировался фрагмент тяжелой цепи миозина, что говорит о деструктивных изменениях в актомиозиновом комплексе.

3. На основании результатов протеомного исследования ферментированной мышечной ткани, а также результатов определения протеолитической активности и молекулярно-генетического скрининга генов протеиназ, разработан и запатентован бактериальный препарат из перспективных в отношении протеолиза стартовых культур: *P. acidilactici* 38, *L. curvatus* 1 и *S. carnosus* 108. Разработан проект нормативной документации на бактериальный препарат «ФермБиакт» (ТУ и ТИ).

4. Установлено, что по органолептическим показателям образцы сырокопченых колбас соответствовали данному виду продукции. Гистологическое исследование показало, что структура образца СКК отличалась меньшей компактностью и большими деструктивными изменениями мышечных волокон по сравнению со структурой образца БСК, масса фарша была пронизана микрокапиллярами, местами сливающимися друг с другом, микрофлора бактериального препарата располагалась в виде множественных крупных микроколоний в мелкозернистой белковой массе. Исследование физико-химических показателей колбас показало их соответствие требованиям ГОСТ 33708.

5. При определении микробиологических показателей в результате T-RFLP-анализа и MALDI-TOF установлено, что во всех образцах присутствовали лактобактерии различных видов. Максимальное количество выявлено в образце СКК (69,6%), а минимальное – в образце СКХХ (57,9%); в образце СКК были идентифицированы бактерии, входящие в состав разработанного бактериального препарата.

6. Результаты протеомного исследования образцов сырокопченых колбас показали, что бактериальная композиция СКК способствовала образованию N- и C-концевых фрагментов тяжелых и легких цепей миозина, а также более активному разрушению тканевых ферментов (мышечной пируватдегидрогеназы E1, креатинфосфаткиназы, енолазы, альдолазы A и

глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы) по сравнению с образцом, в котором использовалась импортная композиция СКХХ.

7. В результате протеомного исследования образцов ферментированной мышечной ткани и сырокопченых колбас было выявлено 3 пептида, представляющих интерес в отношении проявления биологической активности: SDEEVEHVEEEYEEEEE (белок-предшественник – тропонин Т), TKQEYDEAGPSIVHRK (белок-предшественник – α-актин) и NAWGKVEADVAGHGQ (белок-предшественник – миоглобин). Биоинформатический анализ пептидов позволил спрогнозировать у них противоопухолевую и антимикробную активность, а также исключить их токсичность.

8. Разработана схема направленного отбора стартовых культур, способствующих образования биологически активных пептидов в мясном сырье и готовых мясных продуктах. Показано, что в условиях импортозамещения разработанный бактериальный препарат «ФермБиакт» является эффективной альтернативой импортным бактериальным препаратам для мясной промышленности.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНО В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ

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

1. Chernukha, I.M. Effect of cholesterol-lowering starter cultures in smoked sausages on the formation of bioactive peptides and lipid profile in triton-induced hyperlipidemic rats / I.M. Chernukha, N.G. Mashentseva, **D.A. Afanasiev**, G.U. Laptev, L.A. Ilina // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – № 333. – P. 012049 **(Web of Science)**

2. Чернуха, И. М. Образование биологически активных пептидов в мясном сырье под влиянием протеаз различного происхождения / И.М. Чернуха, Н.Г. Машенцева, Н.Л. Вострикова, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева, **Д.А. Афанасьев**, А.А. Бажаев // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – № 6. – С. 1247–1261 **(Scopus)**

3. Чернуха, И. М. Образование биологически активных пептидов в мясном сырье под влиянием лизатов стартовых бактериальных культур / И.М. Чернуха, Н.Г. Машенцева, Н.Л. Вострикова, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева, **Д.А. Афанасьев** // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55. – № 6. – С. 1182–1203 **(Scopus)**

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

4. Chernukha, I.M. Biologically active peptides of meat and meat product proteins: a review. Part 1. General information about biologically active peptides of meat and meat products / I.M. Chernukha, N.G. Mashentseva, **D.A. Afanasev**, N.L. Vostrikova // Theory and Practice of Meat Processing. – 2019. – T.4. – № 4. – C. 12–16.

5. Chernukha, I. M. Biologically active peptides of meat and meat product proteins: a review. Part 2. Functionality of meat bioactive peptides / I.M. Chernukha, N.G. Mashentseva, **D.A. Afanasev**, N.L. Vostrikova // Theory and Practice of Meat Processing. – 2020. – T.5. – № 12. – C. 12–19.

6. **Афанасьев, Д.А.** Биологически активные пептиды как продукт микробной ферментации мясного сырья и готовых мясных продуктов / Д.А. Афанасьев, Н.Г. Машенцева, И.М. Чернуха // Пищевая промышленность. – 2019. – № 4. – С. 20–22.

7. **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.

8. **Афанасьев, Д.А.** Оценка функциональности пептидов с применением методов биоинформатики / Д.А. Афанасьев, Н.Г. Машенцева, И.М. Чернуха, М. Ахангаран, М. Гхаравири // Все о мясе. – 2021. – № 6. – С. 48–53.

Статьи и материалы конференций, индексированные в РИНЦ

9. **Афанасьев, Д.А.** Изучение влияния композиции стартовых культур на образование биологически активных пептидов в мясном сырье / Д.А, Афанасьев, Г.Е. Индисова, Н.Г. Машенцева, И.М. Чернуха // Биотехнология и продукты биоорганического синтеза. Сборник материалов национальной научно-практической конференции. – 2018. – С. 124–127.

10. Чернуха, И.М. Использование молекулярно-генетических методов при микробиологической оценке ферментированных пищевых продуктов / И. М. Чернуха, Н.Г. Машенцева, В.А. Будаева, **Д.А. Афанасьев** // Биотехнология и продукты биоорганического синтеза. Сборник материалов национальной научно-практической конференции. – 2018. – С. 301–304.

11. Мякишева, Е.В. Определение белкового профиля говядины в ходе протеолиза под действием лактобактерий / Е.В. Мякишева, **Д.А. Афанасьев**, А.А. Бажаев, И.М. Чернуха, Н.Г. Машенцева // Развитие пищевой и перерабатывающей промышленности России: кадры и наука 2017. – 2017. – С. 64–69.

12. Харина, А.П. Изучение влияния стартовых культур рода *Pediococcus* на белковый профиль и микробиологические показатели мясного сырья / А.П. Харина, **Д.А. Афанасьев**, Н.Г. Машенцева, И.М. Чернуха // Развитие пищевой и перерабатывающей промышленности России: кадры и наука 2017. – 2017. – С. 78–83.

13. **Афанасьев, Д.А.** Изучение влияния ферментов различного происхождения на образование биологически активных пептидов в мясном сырье / Д.А. Афанасьев, И.М. Чернуха, Н.Г. Машенцева // Передовые пищевые технологии: состояние, тренды, точки роста. – 2018. – С. 12–18.

14. **Афанасьев, Д.А.** Особенности воздействия протеаз различного происхождения на процесс образования биологически активных пептидов в мясном сырье и готовых мясных продуктах / Д.А. Афанасьев, Н.Г. Машенцева, И.М. Чернуха, Л.И. Ковалев // Сборник докладов XIV международного биотехнологического форума «РОСБИОТЕХ-2020». – 2020. – С. 170–173.

15. **Афанасьев, Д.А.** Оценка пептидного потенциала стартовых культур, а также их композиции, в мясном сырье / Д.А. Афанасьев, И.М. Чернуха, Н.Г. Машенцева // «Актуальная биотехнология». - 2020. – Т. 3. – № 34. – С. 123–127.

16. Чернуха, И.М. Образование биоактивных пептидов под действием микроорганизмов и их идентификация / И.М. Чернуха, Н.Г. Машенцева, **Д.А. Афанасьев** // Мясные технологии. – 2020. – № 2 (206). – С. 42–46.

Учебные пособия

17. Машенцева Н.Г. Биологически активные пептиды: роль ферментолиза в их образовании / Н.Г. Машенцева, И.М. Чернуха, **Д.А. Афанасьев**, Н.Л. Вострикова // Учебное пособие. – М.: МГУПП, 2020 – 130 с.

Патенты

18. Патент № 2 753 890. Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01). Препарат бактериальный протеолитический для производства ферментированных мясных изделий / Машенцева Н.Г., Чернуха И.М., **Афанасьев Д.А.**; патентообладатель ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств». – № 2021101581; заявл. 26.01.2021; опубл. 24.08.2021, Бюл. № 24. – 8 с.

Список сокращений и условных обозначений

БАП – биологически активные пептиды

КРС – крупный рогатый скот

1-ДЭ – одномерный электрофорез

2-ДЭ – двумерный электрофорез

ИЭФ – изоэлектрофокусирование

ПА – протеолитическая активность

БСК – образец сырокопченой колбасы, выработанный без использования стартовых культур

СКК – образец сырокопченой колбасы, выработанный с использованием разработанной композиции стартовых культур разработки ФГБОУ ВО МГУПП

СКХХ – образец сырокопченой колбасы, выработанный с импортным бактериальным препаратом Bactoferm SM 194 компании «Christian Hansen», Дания

МКБ – молочнокислые бактерии