На правах рукописи

ХВОСТОВ ДАНИИЛ ВЛАДИСЛАВОВИЧ

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОТИПИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА БЕЛКОВОГО СОСТАВА В МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ MRM МЕТОДОМ

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:	Доктор технических наук, **Вострикова Наталия Леонидовна**
Официальные оппоненты:	**Красуля Ольга Николаевна** доктор технических наук, профессор, Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, кафедра «технология хранения и переработки продуктов животноводства»
	Тихонов Сергей Леонидович доктор технических наук, доцент, Уральский государственный экономический университет, Институт торговли, пищевых технологий и сервиса, заведующий кафедры пищевой инженерии
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образователь учреждение высшего образования «Орловский государствен аграрный университет имени И.В. Парахина»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. В __ часов __ минут на заседании диссертационного совета Д 006.021.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» Российской академии наук по адресу: 109316, Москва, ул. Талалихина, д.26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им В.М. Горбатова» РАН, 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. Идентификация различных видов животных, используемых в промышленном производстве мясных продуктов не теряет своей актуальности и на сегодняшний день, ввиду возрастающей потребности в мясном белке и увеличением маржинальности перерабатывающих предприятий. Все это приводит к фактам непреднамеренных и/или намеренных практик, вводящих в заблуждение потребителя своими заявления о чистоте и стандартизованном соответствии продукта, которые могут повлиять на здоровье человека (Ruiz Orduna и соавт., 2017). Незаявленные мясные и немясные ингредиенты могут быть источником белков, ответственных за тяжелые реакции и аллергической пищевой непереносимости у потребителей (Mikołajczak и соавт., 2019). Случайное загрязнение или преднамеренная контаминация мяса разными видами животных и птицы, является глобальной проблемой (Fornal и Montowska, 2019), хотя подлинность продуктов питания и правильная маркировка регламентированы многими законами и правилами (Постановление (ЕС) № 178/2002 Европейского парламента, ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки»). Поэтому необходима постоянная разработка передовых аналитических методов для эффективного тестирования подлинности и соответствия состава пищевых продуктов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с различными детекторами масс-спектрометрии (МС), применяемыми в современной протеомике, привела к технологическим разработкам и новым приложениям для рутинных задач. Методы жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии на основе протеомики (LC-MS) в последнее время получили все большее распространение в пищевой промышленности, например, для идентификации пептидов, полученных из белка, устойчивых к термической обработке пищевых продуктов и, таким образом, полезных для аутентификации пищевых продуктов.

Всесторонние обзоры текущей литературы по масс-спектрометрическому обнаружению уникальных пептидов для одиннадцати видов мяса (курица, утка,

гусь, индейка, свинина, говядина, баранина, кролик, буйвол, олень и лошадь) и шести аллергенных пищевых ингредиентов (молоко, яйцо, арахис, соя, фундук и миндаль) были опубликованы в работах авторов Stachniuk и соавт., (2019) и Pilolli и соавт., (2020). Однако практическое применение вышеуказанных разработок, и доведение их до реализации и каких-либо методических решений не было осуществлено. Поэтому **актуальной задачей** является аутентификация пищевых продуктов, которая тесно связана с качеством и безопасностью пищевых продуктов, поскольку обычная фальсификация может повлиять на общие характеристики пищевых продуктов и может вызвать заболевания пищевого происхождения после потребления.

Степень разработанности темы. Методологической основой диссертационной работы служили труды отечественных ученых: Чернухи И.М., Востриковой Н.Л., Куликовского А.В., Ковалевой М.А., Дзантиева Б.Б. Подавляющее большинство исследований LC-MS/MS зарубежных ученых на основе белка в мясе было сосредоточено в основном на мясе кур (Claydon и соавт., 2015, Li и соавт., 2018, Montowska и Fornal, 2017, Sentandreu и соавт., 2010, Wang и соавт., 2018), свинине (Fornal и Montowska, 2019, Li и соавт., 2018, Nalazek-Rudnicka и соавт., 2019, Ruiz Orduna и соавт., 2017, Von Bargen и соавт., 2014), говядине (Claydon и соавт., 2015, Fornal и Montowska, 2019, Li и соавт., 2018, Montowska и Fornal, 2017, Montowska и Fornal, 2019, Wang и соавт., 2018), конине (Claydon и соавт., 2015, Von Bargen и соавт., 2014), ягнятине (Li и соавт., 2018, Naveena и соавт., 2017, Prandi и соавт., 2019, Wang и соавт., 2018), крольчатине (Prandi и соавт., 2019, Stachniuk и соавт., 2020), мясе уток (Li и соавт., 2018, Montowska и Fornal, 2017, Montowska и Fornal, 2019, Wang и соавт., 2018) и гусей (Fornal и Montowska, 2019, Montowska и Fornal, 2019), и в меньшей степени на индейке (Prandi и соавт., 2019), буйволятине (Naveena и соавт., 2017) и мясе благородного оленя (Prandi и соавт., 2019).

Отдельные этапы настоящей диссертационной работы выполнены в рамках:

- плана НИОКР ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН «Формирование научного и технологического базиса по выявлению и

идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белково-пептидной природы в мясных продуктах» (№ 0585-2019-0005) к государственному заданию;

- гранта РФФИ № 19-316-90053 «Разработка методологии идентификации протеотипических пептидов маркерных белков при помощи скрининговых MRM методов в биологических матрицах» (2019-2021 г.);

- гранта РНФ № 16-16-10073 «Изучение механизмов биосинтеза и деградации специфических биологически активных белков и пептидов под действием ферментативного и неферментативного протеолиза тканей *Sus scofa* и *Bos taurus* и разработка на их основе специализированных пищевых продуктов» (2018-2020 г.).

Цель исследований.

Целью работы является разработка методики исследования протеотипических пептидов для аутентификации и определения мультивидов ВЭЖХ-МС/МС методом. Методология охватывает три основных вида мясного сырья, представляющих практический интерес, как основного сырья, используемого в мясной промышленности.

Основные задачи исследования:

- на основе систематизации и анализа имеющихся научных данных с использованием биоинформационных программ подобрать условия масс-спектрометрического детектирования для постановки методики исследования,

- провести маркерную идентификацию мышечной ткани свинины, говядины и мяса птицы (курица), внесенных компонентов в рецептуру вареных колбас не мясного происхождения (сухое молоко, меланж) ВЭЖХ-МС/МС методом и определить наилучшие протеотипические пептиды, которые можно использовать в качестве маркеров в готовых мясных продуктах на примере модельных рецептур, выработанных по общей технологии колбасных изделий вареных,

- установить селективность протеотипических пептидов для мышечной ткани основного мясного сырья (на примере свинины),

- разработать методику идентификации мышечной ткани основного мясного сырья при помощи высокотехнологических средств измерений (высокодостоверного подтверждающего метода исследований пептидома),

установить пределы обнаружения и количественного определения содержания мышечной ткани (на примере свинины и говядины).

Научная новизна исследования.

Установлены и научно обоснованы наилучшие протеотипические пептиды мышечной ткани основного мясного сырья (говядина, свинина, курица) и вспомогательных ингредиентов (сухое молоко, меланж) на примере модельных рецептур, изготовленных по общей технологии колбасных изделий вареных.

Получены новые данные по идентификации протеотипических пептидов в разных типах ткани свинины и установлена специфичность маркерных пептидов для мышечной ткани.

Обоснована возможность создания полуколичественной методики для идентификации мышечной ткани основного сырья, используемого в мясной промышленности (свинины и говядина) в многокомпонентной (бесструктурной) матрице при анализе 7 протеотипических пептидов.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Научно обоснованы и подобраны критерии для оценки нахождения наилучших протеотипических пептидов в протеомных исследованиях мясного сырья. Данные могут послужить для пополнения существующих пептидных баз данных по маркерным пептидам.

Разработана мультиплексная методика для детектирования и полуколичественной оценки мышечной ткани основных видов мясного сырья с использованием ВЭЖХ-МС/МС по технологии мониторинга множественных реакций (MRM).

Разработано приложение по идентификации мышечной ткани для методических рекомендаций «Методика измерений массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной продукции, выработанной по национальным и межгосударственным стандартам (за исключением консервов), методом флуоресценции для детектирования продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени» (№ 241.0067/RA.RU.311866/2021, на 25 стр.).

Основные положения, выносимые на защиту.

Обосновано применение ВЭЖХ-МС/МС метода для нахождения и селективного определения протеотипических пептидов, как маркеров мышечной ткани в мясном сырье и не мясных ингредиентах в модельных рецептурах, выработанных по общей технологии вареных колбасных изделий.

Мультиплексная ВЭЖХ-МС/МС методика полуколичественного определения мышечной ткани по протеотипическим пептидам для основного сырья (свинина, говядина) в многокомпонентной (бесструктурной) матрице MRM методом.

Степень достоверности и апробации работы.

Результаты выполненной работы и их достоверность подтверждается корректным использованием научно-технической литературы, современных экспериментальных методов и методик проведения исследований, полученных результатов и выводов по работе. Научные положения базируются на общедоступных достижениях как фундаментальных, так и прикладных научных дисциплин, связанных с тематикой диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы были доложены на X-Евразийском экономическом форуме молодежи «Россия, Азия, Африка, Латинская Америка: экономика взаимного доверия», доклад в финале конкурса «Качество и безопасность товаров как факторы обеспечения конкурентоспособности на внутреннем и внешнем рынках»,17 апреля 2019 г, УрГЭУ; Научно-практической конференции, посвященной 90-летию ВИЖа «Научное обеспечение развития животноводства в Российской Федерации» (23-25 сентября 2019 г.); Международной конференции 2019 (9-й Международный симпозиум по последним достижениям в области анализа пищевых продуктов (RAFA 2019) 5—8 Ноября 2019, Прага, Czech Republic; Международной конференции 2020 ASAS-CSAS-WSASAS Virtual Annual Meeting and Trade Show July 19-23, 2020; Всероссийской с международным участием онлайн-конференции «Современная биотехнология: актуальные вопросы, инновации и достижения» ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет». – Кемерово, 2020; РосБиоТех-2020 XIV международном биотехнологическом Форум-Выставке Москва, 17 - 19 ноября

2020 г.; на XXII Международной научно-практической конференции, посвященной памяти В. М. Горбатова «Пищевые системы. Биобезопасность, технологии и инжиниринг», Москва, 25 ноября 2020 г.

Личное участие соискателя.

Диссертационная работа выполнена соискателем лично и включает анализ научно-технической литературы, выбор и обоснование экспериментальных методов исследований, выполнение эксперимента, обобщение полученных результатов, выводы по работе. Разработано аналитическое приложение в качестве применения скринингового метода в аттестованной методике измерения массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной продукции. Соавторство по отдельным этапам работы отражено в списке публикаций.

Публикации.

По результатам, изложенным в диссертационной работе, опубликовано 13 печатных работ, в т. ч. 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, характеристику объектов и методов исследования, экспериментальную часть, результаты и анализ данных, экономическую эффективность разработанной методики анализа, выводы, список использованных источников, приложения. Работа содержит 151 страницы, 10 таблиц, 20 рисунков, 4 приложения. Список литературы содержит 152 наименования отечественных, зарубежных авторов и интернет-ресурсов.

Содержание работы

ВВЕДЕНИЕ. Обоснованы актуальность и целесообразность проводимой работы, сформулирована цель и задачи исследований, практическая значимость работы и положения, выносимые на защиту.

ГЛАВА 1. Представлен анализ отечественной и зарубежной литературы относительно подходов к изучению механизмов синтеза и методов анализа белков. Представлены такие методы измерения количества белков как спектрофотометрические, хроматографические и масс-спектрометрические.

Рассмотрены основные подходы протеомики в области идентификация и измерения видоспецифических пептидов и белков. Рассмотрены аналитические инструменты распознавание видоспецифических белков с помощью ДНК-гибридизации и ПЦР анализа, иммуноанализов (ELISA), ВЭЖХ МС, применяемой для обнаружения биомаркерных пептидов.

ГЛАВА 2. Представлены характеристики объектов исследований, организация и схема выполнения работы, подготовка проб и методы анализа.

В соответствии с целью работы объектами исследований являлись:

- модельные мясные системы из говядины в/с (97 мас. % мыш. ткани), свинины п/ж (50 мас. % мыш. ткани), свинины жирной (20 мас. % мыш. ткани), и немясные ингредиенты, соответствующие основному колбасному фаршу по ГОСТ 23670-2019. Содержание мышечной ткани по говядине и свинине отвечающие основным категориям мясной продукции: 8% (мас. %), 16% (мас. %) и 50% (мас. %) и 8% (мас. %) соответственно. Также были проанализированы модельные рецептуры без термической обработки и с использованием варки (режимы согласно ТИ к ГОСТ 33673-2015 Изделия колбасные вареные. Общие технические условия) (**п. 3.2, 3.3**); говяжьи сердца сырые (**п. 3.2**); грудные мышцы кур (*m. Pectoralis major*) (**п. 3.2**); свиные аорты и сердца; мясные консервы «Здоровое сердце», содержащие ткани миокарда (сердце) и аорты свиньи, разработанные в ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН; консервы мясные «Сердце свиное в собственном соку», выработанные по ГОСТ Р 55477-2013, изготовленные в ЗАО «Йошкар-олинский мясокомбинат» (**п. 3.3**); модельные фарши в колбасной оболочке из *m.L. Dorsi* свинины и говядины в соотношении 1:3, 1:1, 3:1, 20:1 (**п. 3.4**);

В работе использованы биохимические и протеомные методы исследования белков, включающие в себя спектрофотометрию, жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией, биоинформационный анализ и статистическую обработку данных.

Протеомные исследования: <u>биоинформационный анализ</u> (1) – подбор MRM для 58 последовательностей пептидов (Stachniuk и соавт., 2020) проводили в

программе Skyline (https://skyline.ms/), для обеспечения специфичности пептида был выполнен поиск в базе данных BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/); ферментативный гидролиз (2) – все реагенты использовались чистоты U.S.P. или выше. Все используемые растворители, включая воду, использовались маркировкой LC / MS. Белки экстрагировали из образцов и расщепляли трипсином на основе ранее опубликованных исследований (Ruiz Orduna и соавт., 2017, Khvostov и соавт., 2020, Stachniuk и соавт., 2020); флуоресцентный анализ (3) – содержание белка измеряли с помощью набора для анализа белка Quant-it (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя; жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (4) – использовали колонку ZORBAX Eclipse Plus C18 с быстрым разрешением HD 2,7 мкм (50 × 2,1 мм; Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), хроматографическое разделение проводили в Agilent 1260 Infinity ВЭЖХ (США), детекцию осуществляли с помощью трехквадрупольного масс-спектрометра (QQQ 6410, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), данные ВЭЖХ / ESI-MC были получены с использованием программного обеспечения MassHunter B.04.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), калибровочные кривые были построены с использованием расчета площади полного ионного тока (TIC) (сумма двух отслеживаемых переходов), так и сигнала первого перехода (наиболее интенсивного), что дало полностью сопоставимые результаты(Khvostov и соавт., 2020); статистика и обработка данных (5) – для целей статистической обработки использовался двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) в программе STATISTICA 10.0, извлечение и обработка данных производилась в Microsoft Excel 2019 (США).

Схема выполнения работы представлена на рисунке 1.

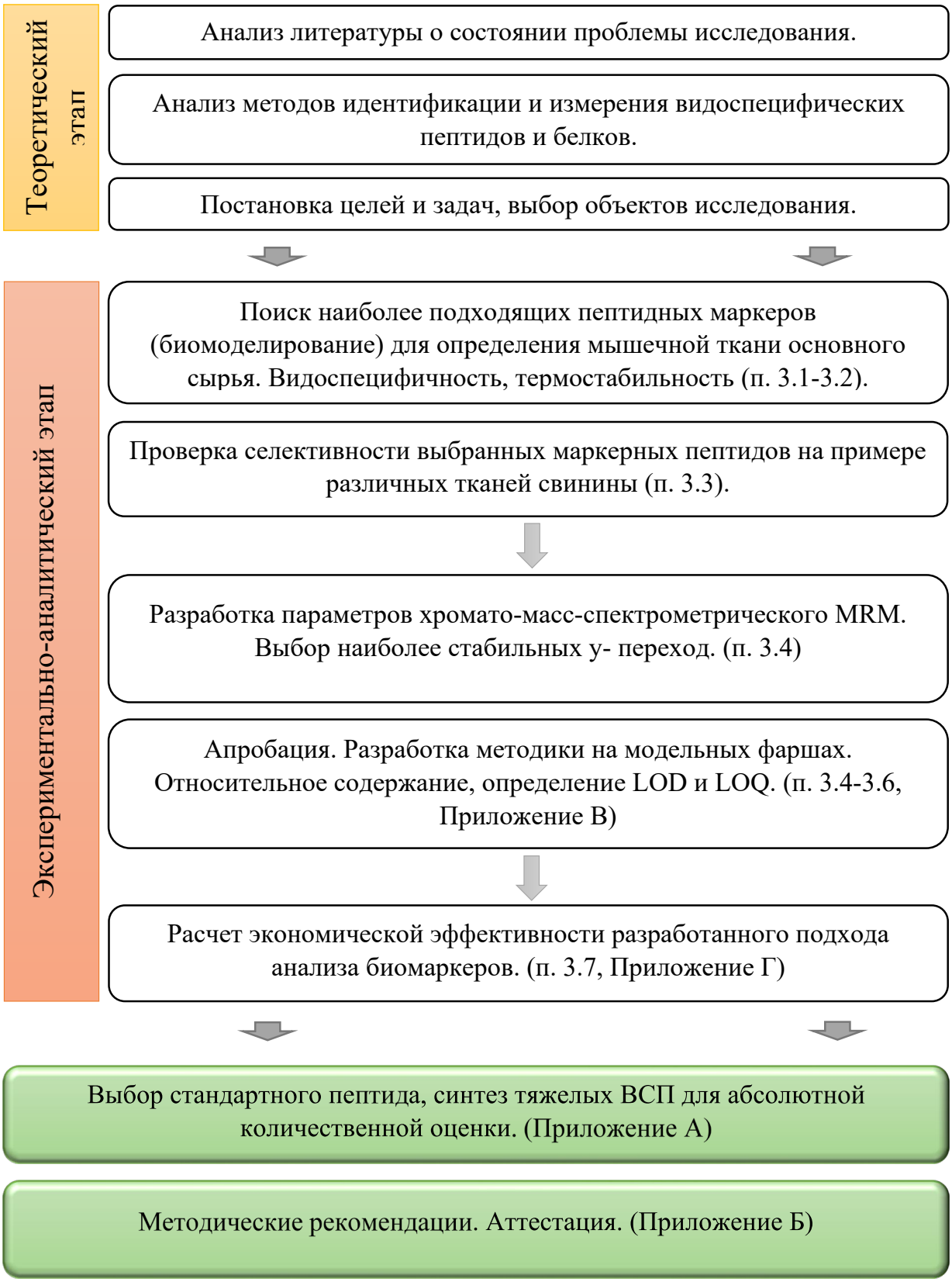

Рисунок 1 – Схема выполнения диссертационной работы

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С целью выявления пептидов функциональности и аутентификации мясного сырья и готовых мясных продуктов вначале были проведены работы по определению белковых маркеров и получены спектры пептидов на примере количественной идентификации маркерных пептидов мышечной ткани говядины, свинины и птицы (курица), как основного сырья, используемого при переработке. Данные работы также направлены на расширение научного и технологического базиса по выявлению и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белково-пептидной природы в мясных продуктах.

3.1. Применение аспектов биомоделирования

Для выбора потенциальных маркерных пептидов были отобраны пептиды (таблицы 1 и 2), длина которых превышала шесть аминокислот, в соответствии с ранее указанными протоколами (Stachniuk и соавт., 2019). Таким образом, длина пептида обеспечивает видоспецифичность мышечного белка. Затем пептидные ионы-кандидаты были подвергнуты перекрестной проверке на хроматограмме других видов мяса, и были отобраны только те пептиды, которые присутствовали в одном типе мяса. Кроме того, для обеспечения специфичности пептида был выполнен поиск (рисунок 2) в базе данных BLAST (англ. *Basic Local Alignment Search Tool* - средство поиска основного локального выравнивания).

sp|P02192|MYG_BOVIN Myoglobin OS=Bos taurus OX=9913 GN=MB PE=1 SV=3

Sequence ID: Query_79601 **Length:** 154 **Number of Matches:** 1

Range 1: 1 to 154 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
276 bits(705)	6e-102	Compositional matrix adjust.	136/154(88%)	142/154(92%)	0/154(0%)

```
Query  1    MGLSDGEWQLVLNVWGKVEADVAGHGQEVLIRLFKGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMKASE  60
            MGLSDGEWQLVLN WGKVEADVAGHGQEVLIRLF GHPETLEKFDKFKHLK+E EMKASE
Sbjct  1    MGLSDGEWQLVLNAWGKVEADVAGHGQEVLIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE  60

Query  61   DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAELTPLAQSHATKHKIPV YLEFISEAIIQVLQSKH  120
            DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAE+  LA+SHA KHKIPV YLEFIS+AII VL +KH
Sbjct  61   DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPV YLEFISDAIIHVLHAKH  120

Query  121  PGDFGADAQGAMSKALELFRNDMAAKYKELGFQG  154
            P DFGADAQ AMSKALELFRNDMAA+YK LGF G
Sbjct  121  PSDFGADAQAAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFHG  154
```

Рисунок 2 – Сравнение белка миоглобина разных видов животных при помощи BLAST.

3.2 Маркерная идентификация пептидов

Проведено изучение биомаркеров для идентификации говядины (таблица 1). Разработанная методика позволила одновременно идентифицировать и сравнивать до 13 биомаркеров пептидов говядины (рисунок 2). Используя критерий S/N, можно было сравнить пептидные маркеры на подлинность для сырого и термически обработанного мясного продукта. Считались успешными кандидатами, у которых отношение сигнал / шум было выше 3.

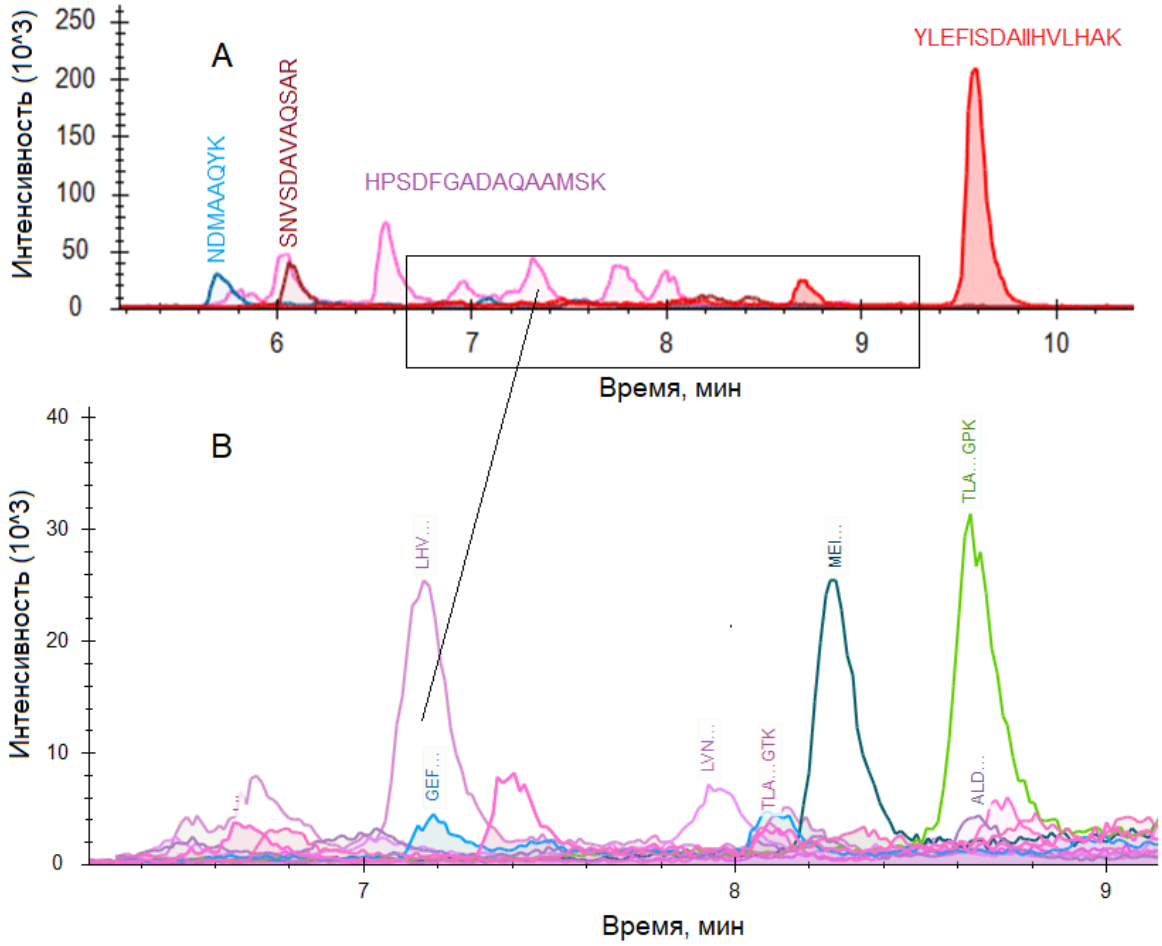

Рисунок 2 – Хроматограммы отобранных биомаркеров, идентифицирующих мышечную ткань говядины: А - основные пептиды, В - минорные пептиды.

Из анализа видоспецифических маркерных пептидов были отобраны три пептида (**NDMAAQYK** и **YLEFISDAIIHVLHAK** из миоглобина и **SNVSDAVAQSAR** из белка триозофосфат-изомеразы) для определения мышечной ткани в говядине с учетом следующих факторов: высокая распространенность в мышечных тканях (> 50*10^3 усл. ед. интенсивности), хорошее соотношение

сигнал / шум при низких концентрациях (S\N> 10), высокая специфичность и наличие сайтов расщепления, специфичных для трипсина, на обоих концах белковой цепи. Для образцов с двумя уровнями концентрации и при тепловом воздействии (варки) отношение S/N были установлены выше 10. Для пептида HPSDFGADAQAAMSK проводился дополнительный поиск MRM. Использовались два родительских иона 766,8 m/z и 511,6 m/z. Наиболее значимым оказался ион 511.6 m/z. Интенсивность MRM по данной массе увеличилась на 40,0±7,4% по сравнению с ионом 766,8 m/z.

Таблица 1 – Сравнение маркерных пептидов по характеристикам сигнал/шум для двух концентраций и двух режимов приготовления (без и с термообработкой) говядины.

Наименование маркерного белка	Последовательность протеотипического пептида	Модельные смеси 8,0% (мас. %) (говядины)		Модельные смеси 16,0% (мас. %) (говядины)	
		Без варки (S/N±SD)	Варка (S/N±SD)	Без варки (S/N±SD)	Варка (S/N±SD)
Myoglobin	**NDMAAQYK**	**12,50 ±2,45**	**24,61 ±4,82**	**11,53 ±2,64**	**127,66 ±12,51**
Triosephosphate isomerase	**SNVSDAVAQSAR**	**13,34±2,61**	**10,09±1,38**	**13,02±0,23**	**27,82±1,23**
Myoglobin	**YLEFISDAIIHVLHAK**	**3,24±0,64**	**7,79±0,76**	**4,64±1,97**	**24,06±7,58**
Myoglobin	HPSDFGADAQAAMSK расчет по 511 m/z (заморозка)	1,36±0,27	2,14±0,50	1,95±0,17	7,78±0,42
Myosin-2	MEIDDLASNVETISK	2,47±0,48	2,29±0,18	3,5±0,42	8,33±0,79
Myosin-1	TLALLFSGPASGEAEGGPK	1,20±0,23	2,15±0,21	1,55±0,10	8,32±1,85
Myoglobin	HPSDFGADAQAAMSK расчет по 511 m/z	3,70±0,73	2,91±0,34	1,94±1,66	7,43±2,05
Stress-induced-phosphoprotein	ALDLDSNC[+57.0]K	2,51±0,49	1,74±0,51	2,32±1,07	4,66±0,76
β-Hemoglobin	LHVDPENFK	2,82±0,57	2,35±0,23	4,05±0,61	5,30±0,39
Myosin light chain 2f	EASGPINFTVFLNMFGEK	1,31±0,26	1,24±0,12	1,98±0,72	5,09±0,87
Myoglobin	HPSDFGADAQAAMSK расчет по 766 m/z	2,89±0,51	1,68±0,16	4,96±1,76	2,57±0,05
Carbonic anhydrase 3	LVNELTEFAK	1,04±0,26	0,60±0,08	1,78±0,48	2,54±0,24
Carbonic anhydrase 3	GEFQLLLDALDK	1,36±0,22	0,15±0,12	1,93±0,45	2,42±0,20
Myosin-2	TLAFLFSGTPTGDSEASGGTK	5,00±0,84	4,35±0,43	4,49±0,45	1,87±0,21
L-Lactate dehydrogenase A chain	DLADEVALVDVMEDK	0,2±0,12	1,36±0,13	0,58±0,13	0,51±0,35

Проверялось влияние одного цикла заморозки/разморозки образца на интенсивность пептида HPSDFGADAQAAMSK (таблица 1). Для образцов, которые проходили термическую обработку, показатель S/N не изменился. Установлено, что один цикл заморозки/разморозки не влияет на большие концентрации (более 15% (мас. %)) мяса в образцах. При концентрациях меньше 10% (мас. %), падение интенсивности составило до 52,4±15,2%. Для пептидов ALDLDSNC[+57,0]K [20], DLADEVALVDVMEDK и GEFQLLLDALDK [12] была зафиксирована кросконтаминация при высоком содержание другого вида мяса без использования говядины (рисунок 3).

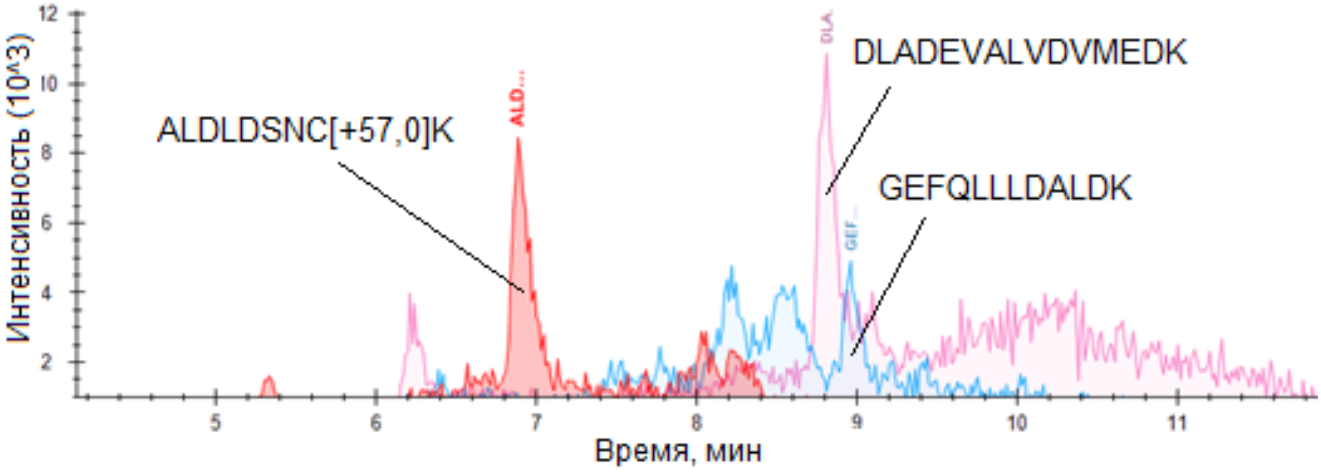

Рисунок 3 – Идентифицированные пептиды ALDLDSNC[+57,0]K, DLADEVALVDVMEDK и GEFQLLLDALDK в пробах, не содержащих говядину.

Некоторые пептиды не прошли пороговую оценку в рамки критерия S/N – выше трех. Пептиды MEIDDLASNVETISK TLALLFSGPASGEAEGGPK из белков миозинового ряда оказались чувствительны к термическому воздействию в образцах с содержанием мышечной ткани в 16% (мас. %). При более низких концентрациях критерий S/N приближался к 2-3. Не удалось подтвердить пептид DLADEVALVDVMEDK во всех типах образцов. Показатель S/N по всем пробам составил не более 2-х. Проведя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA было установлено значимое влияние температуры на интенсивность маркерных пептидов при концентрации 8% (мас. %) (мас. %) (p = 0,021) и 16,0% (мас. %) (p = 0,013) говядины.

Был проведен сравнительный анализ протеотипических пептидов для идентификации мышечной ткани свинины на модельных образцах (таблица 2). Разработанная методика позволила одновременно выявить и сравнить до 20 биомаркерных пептидов свинины (рисунок 4) за короткое время (25 минут).

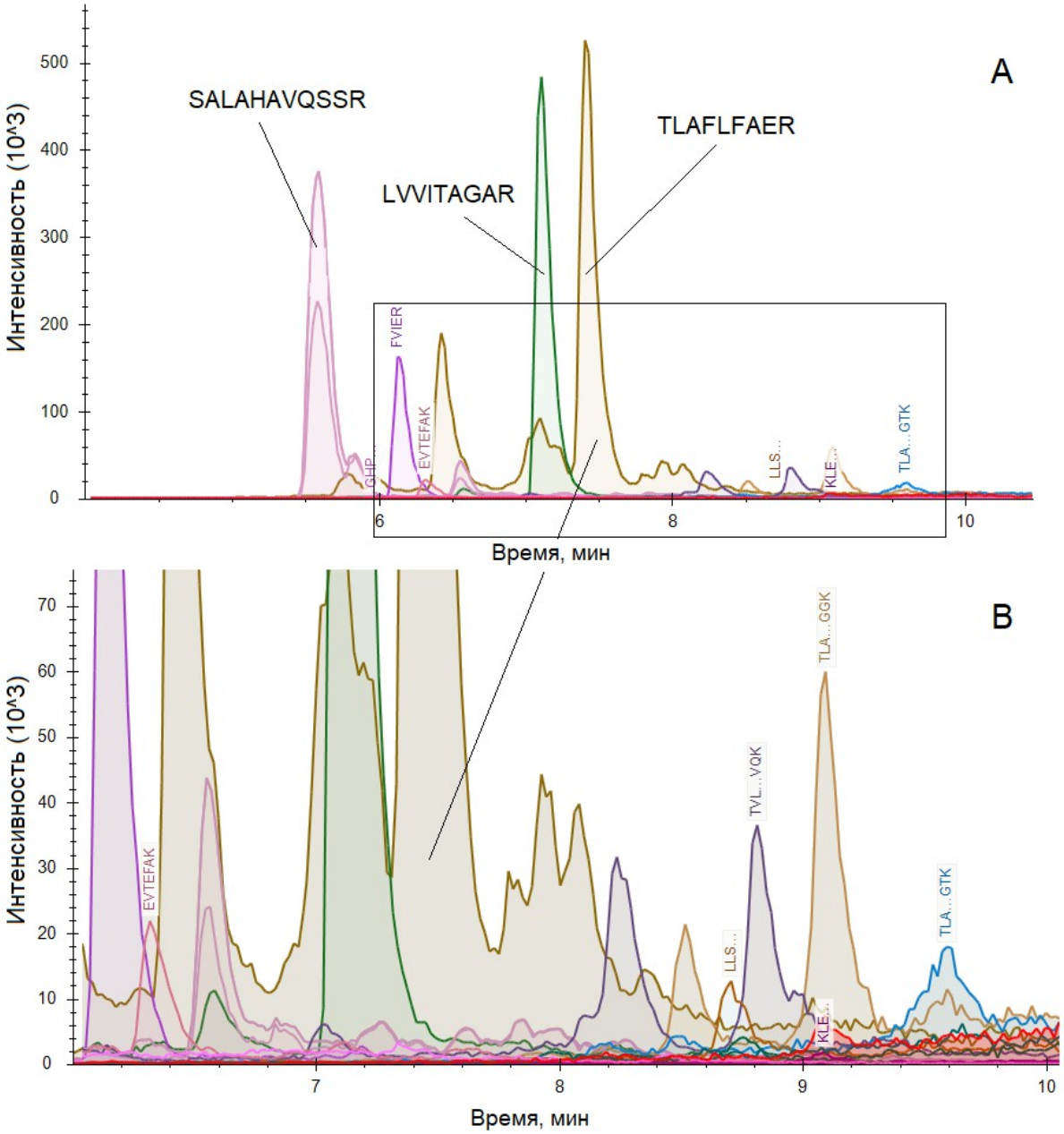

Рисунок 4 – Хроматограммы выбранных биомаркеров, отвечающих за идентификацию мышечной ткани свиньи: А - основные пептиды, В - минорные пептиды.

Из анализа видоспецифичных биомаркеров окончательно были определены три пептида (**SALAHAVQSSR** и **TLAFLFAER** из миозина и **LVVITAGAR** из

белка лактатдегидрогиназы) для идентификации мышечной ткани свинины. Также хочется отметить, что нестабильно себя показали маркеры из белков миоглобина, бета-гемоглобина и *Trifunctional enzyme subunit α*, которые не рекомендуется использовать в количественных исследованиях.

Таблица 2 – Сравнение маркерных пептидов относительно характеристики сигнал/шум для двух концентраций и двух режимов приготовления (без и с термической обработкой).

Наименование маркерного белка	Последовательность маркерного пептида	Модельные смеси 8,0% (мас. %) (свинины)		Модельные смеси 50,0% (мас. %) (свинины)	
		Без варки (S/N±SD)	Варка (S/N±SD)	Без варки (S/N±SD)	Варка (S/N±SD)
Myosin-1	**SALAHAVQSSR**	**63,87 ±12,52**	**74,52 ±14,61**	**121,38 ±2,01**	**126,47 ±6,38**
	TLAFLFTGAAGADAEAGGGK	2,34 ±0,46	1,55 ±0,30	2,10 ±0,85	4,85 ±1,13
Myosin-2	TLAFLFSGAQTGEAEAGGTK	1,17 ±0,23	2,12 ±0,42	2,08 ±0,29	2,11 ±0,51
Myosin-4	**TLAFLFAER**	**13,77 ±2,70**	**21,55 ±4,22**	**32,73 ±10,86**	**50,05 ±16,21**
	KLETDISQIQGEMEDIVQEAR	2,69 ±0,53	3,39 ±0,66	7,15 ±1,43	7,27 ±1,43
	HKYEETQAELEASQK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,11 ±1,82
Myosin-7	LLSNLFANYAGADTPVEK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,52 ±0,37	2,93 ±0,40
Serum albumin	**FVIER**	38,36 ±7,52	53,22 ±10,43	63,77 ±8,01	53,01 ±23,98
	EVTEFAK	7,78 ±1,53	6,34 ±1,24	4,32 ±0,76	6,40 ±2,20
	TVLGNFAAFVQK	8,95 ±1,75	5,78 ±1,02	4,18 ±0,54	4,94 ±0,99
Lactate dehydrogenase	**LVVITAGAR**	**28,64 ±5,61**	**27,99 ±5,49**	**36,47 ±20,20**	**84,60 ±0,61**
Trifunctional enzyme subunit α	FAGGNLDVLK	5,64 ±1,11	5,76 ±1,13	11,59 ±0,46	8,78 ±3,79
β- Enolase	NYPVVSIEDPFDQDDWK	5,01 ±0,98	3,40 ±0,67	7,20 ±2,34	13,94 ±0,66
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	WGDAGATYVVESTGVFTTMEK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	3,40 ±1,81	8,12 ±2,78
Myoglobin	GHHEAELTPLAQSHATK	6,02 ±1,18	0,00 ±0,00	3,99 ±2,36	4,22 ±2,16
	HPGDFGADAQGAMSK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	2,22 ±1,14	7,13 ±1,79
	GHPETLEK	3,62 ±0,71	1,56 ±0,31	2,57 ±0,62	1,26 ±0,06
	YLEFISEAIIQVLQSK	0,00 ±0,00	7,23 ±1,42	4,04 ±0,82	17,55 ±8,31
β-Hemoglobin	FFESFGDLSNADAVMGNPK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,32 ±0,37

Для пептидов VNVDEVGGEALGR, EVTEFAK, FVIER TVLGNFAAFVQK была зафиксирована кросконтаминация при высоком содержание другого вида

мяса без использования свинины (рисунок 5). Пептид FVIER был обнаружен ($p < 0,05$) при анализе образца говяжьей сердечной мышцы, выбранного контрольным образцом для проверки селективности протеотипических пептидов. Измеренная площадь пика составила 60% от площади пика образца фарша свинины с концентрацией 50,0% (мас. %). Таким образом, пептид FVIER не может быть выбран, как однозначный маркер для свиного мяса, ввиду его нахождения у других видов животных. Другие пептиды в образце сердечной мышцы говядины получены из сывороточного альбумина и бета-гемоглобина, где концентрация данных типов белков максимальна. Многие пептиды не прошли соответствие критерию S/N выше трех. Пептиды, представленные из белков миозина, такие как TLAFLFTGAAGADAEAGGGK LLSNLFANYAGADTPVEK и пептиды FFESFGDLSNADAVMGNPK, VNVDEVGGEALGR из бета-гемоглобина не удалось идентифицировать во всех типах образцов. Данные маркеры могут быть чувствительны к циклам заморозки/разморозки и длительному хранению даже при минусовой температуре. Показатель S/N по всем пробам составил не более 1 единицы.

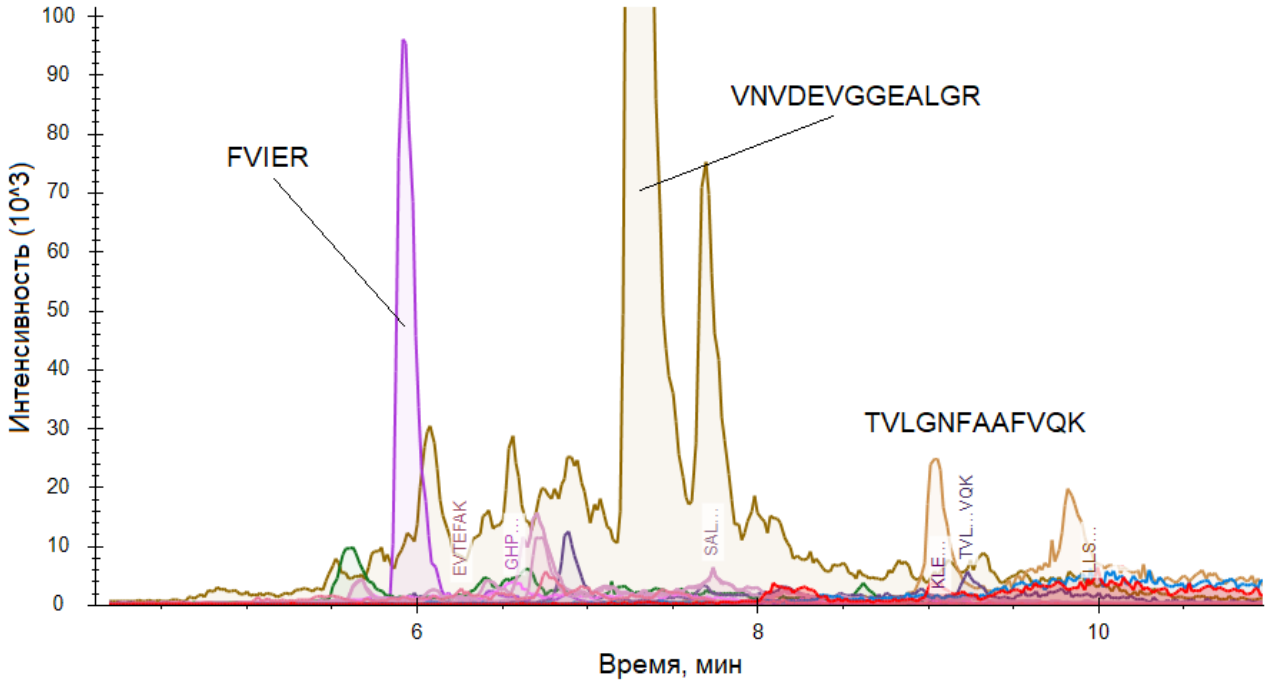

Рисунок 5 – Идентифицированные пептиды VNVDEVGGEALGR, EVTEFAK, FVIER TVLGNFAAFVQK в пробах, не содержащих свинину.

Проведя однофакторный дисперсионный анализ, было установлено значимое влияние температуры на интенсивность маркерных пептидов при двух концентрациях 8,4% (мас. %) (p = 0,037) и 50,0% (мас. %) (p = 0,002). Это может быть связано с доступностью белковых молекул для ферментативного гидролиза при тепловой обработке. Эти данные необходимо будет учитывать при выборе стандартов для разработки количественных методик.

Куриное мясо часто используют как замену более дорогим видам мяса. На рисунке 6 представлены пептиды из креатинкиназы М, миозина, β-енолазы, М-белкоы и пируваткиназы. Они являются источником термостабильных пептидов. Для цепей миозина были проанализированы девять термостойких пептидов. Семейство миозинов является наиболее репрезентативным семейством пептидов в белом мясе из-за его роли в сокращении мышц. Можно выделить два маркера на рисунке 6. Это пептид DQGTFEDFVEGLR, показавший интенсивность сигнала в (10−30)*10^3 усл. ед. интенсивности. Эти результаты согласуются с исследованиями Sentandreu и соавт. (2010) и Wang и соавт. (2018), где был обнаружен только этот пептид. Вторым маркером является пептид VAGAALPCAPAVK. Его интенсивность составляла в диапазоне (60−110)*10^3 усл. ед. интенсивности. Это значение оказалось самым высоким среди всех проанализированных пептидов. Новые данные могут сместить акцент на более детальное изучение пептида VAGAALPCAPAVK.

Пептиды SAMLQLAVTEIEK, DLFDPVIQDR, LSVEALNSLEGEFK и LAMQEFMVLPVGAASFHDAMR показали интенсивность сигнала (10−90)*10^3 усл. ед. интенсивности. Однако разброс интенсивности определяемых переходов (при $p < 0,05$) составлял более 50% для этого ряда маркеров (рисунок 6). Это может сказываться на результатах во время выполнения ферментного гидролиза и подготовки проб, и результаты анализа не смогут пройти порог сходимости в 25 %. Поэтому на данном этапе работ рассматривается только пептид **VAGAALPCAPAVK**, как маркер для количественной оценки, удовлетворяющий вышеперечисленным критериям.

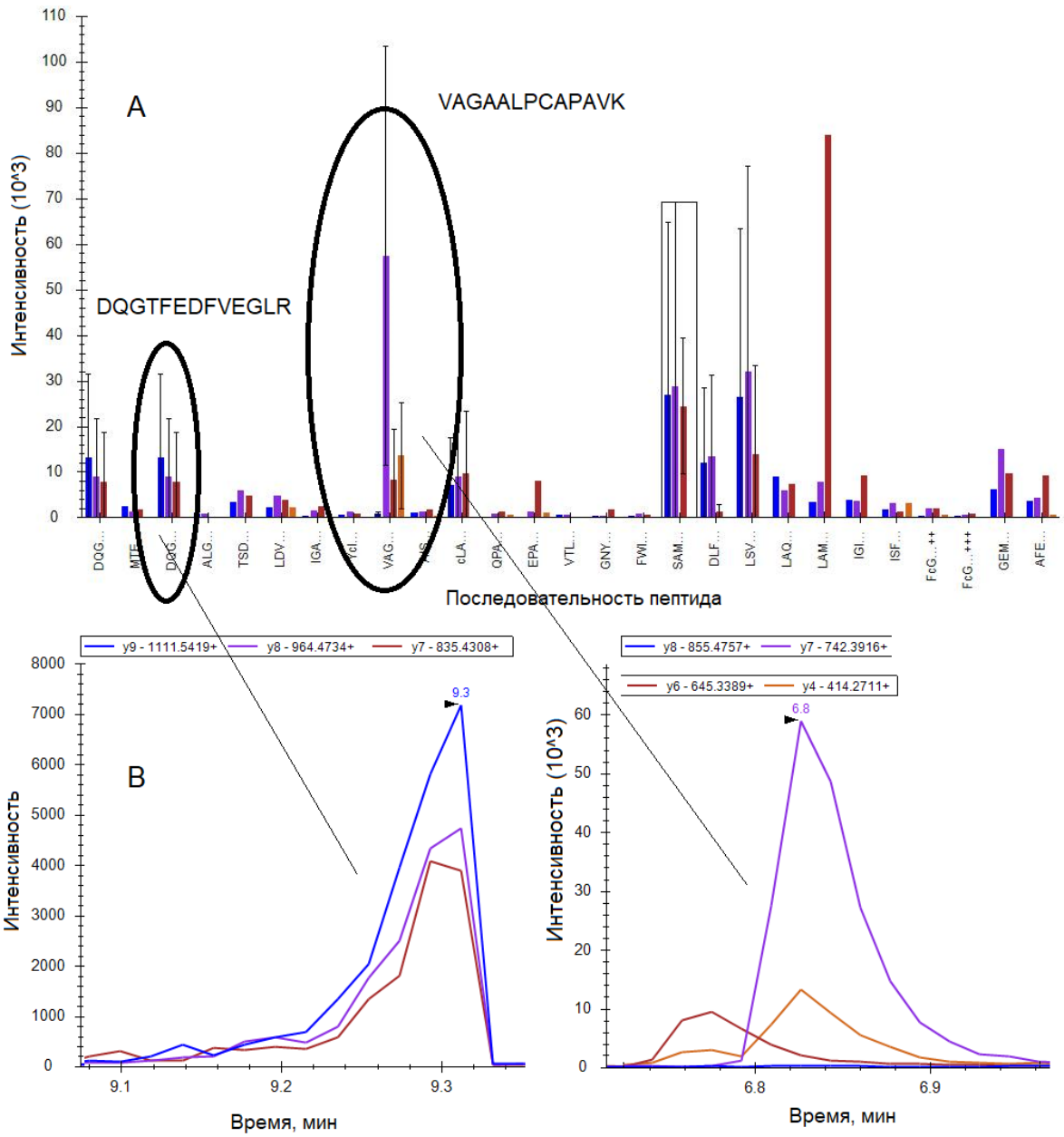

Рисунок 6 – Анализ протеотипических пептидов для мышечной ткани мяса кур: А - сравнение площадей маркерных пептидов для детектирования мяса кур по всем SRM переходам для исследуемых образцов; В - время удерживания, переходы и масс-спектр дочерних ионов для видоспецифичных пептидов DQGTFEDFVEGLR и VAGAALPCAPAVK.

На данном этапе работы были определены биомаркеры других ингредиентов не мышечной природы в готовых продуктах. Колбасный фарш в оболочке, содержащий белковые ингредиенты (*Образец №6)* и тот же образец после термообработки (*Образец №9)* представлены на рисунках 7 и 8. Были выбраны три

маркера на меланж и два на сухое молоко (рисунки 7 и 8). Содержание меланжа определено при добавлении в продукт на уровне 1.5% (мас. %) и сухого молока 2.5% (мас. %). Образцы также в составе содержали говядину и свинину. Для обнаружения перекрестной контаминации параллельно анализировались образцы, не содержащие данных ингредиентов.

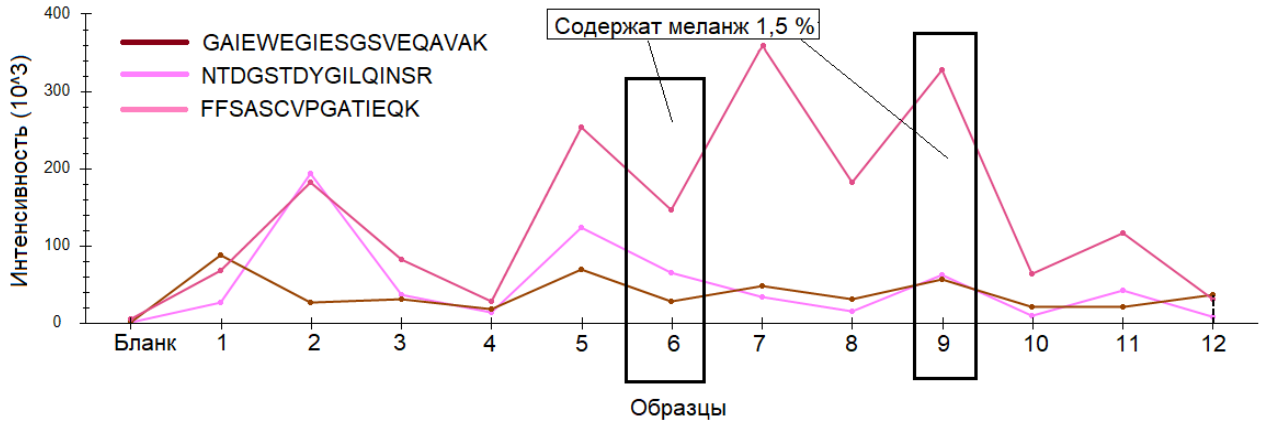

Рисунок 7 – Сравнение площадей интенсивности всех масс фрагментов маркерных пептидов меланжа для исследуемых образцов.

В результате работ маркеры для обнаружения в составе меланжа, представленные на рисунке 7 из белков *Ovotransferrin* и *lysozyme C* показали кросс-контаминацию и не смогли быть идентифицированы в образцах, содержащих данный ингредиент. Концентрация добавленного компонента оказалась ниже предела детектирования.

Для идентификации наличия сухого молока были выбраны два биомаркера из белка *α-s1-casein*. Для пептида YLGYLEQLLR были получены все SRM переходы для термообработанного продукта. Площадь пика для кривой составила 4,5 * 10^6 усл. ед. интенсивности (рисунок 8). При условии линейного снижения интенсивности сигнала возможно определение сухого молока до уровня в 0,05% (мас. %). Однако в продукте, не подвергающимся термической обработке с той же концентрацией добавки в 2.5% (мас. %) было заметное снижение интенсивности на 30,0% для данного маркерного пептида (рисунок 8). Это говорит, о доступности данного пептида в денатурирующих условиях. Пептид **YLGYLEQLLR** хорошо подойдет для количественной оценки сухого молока в мясных продуктах вареных.

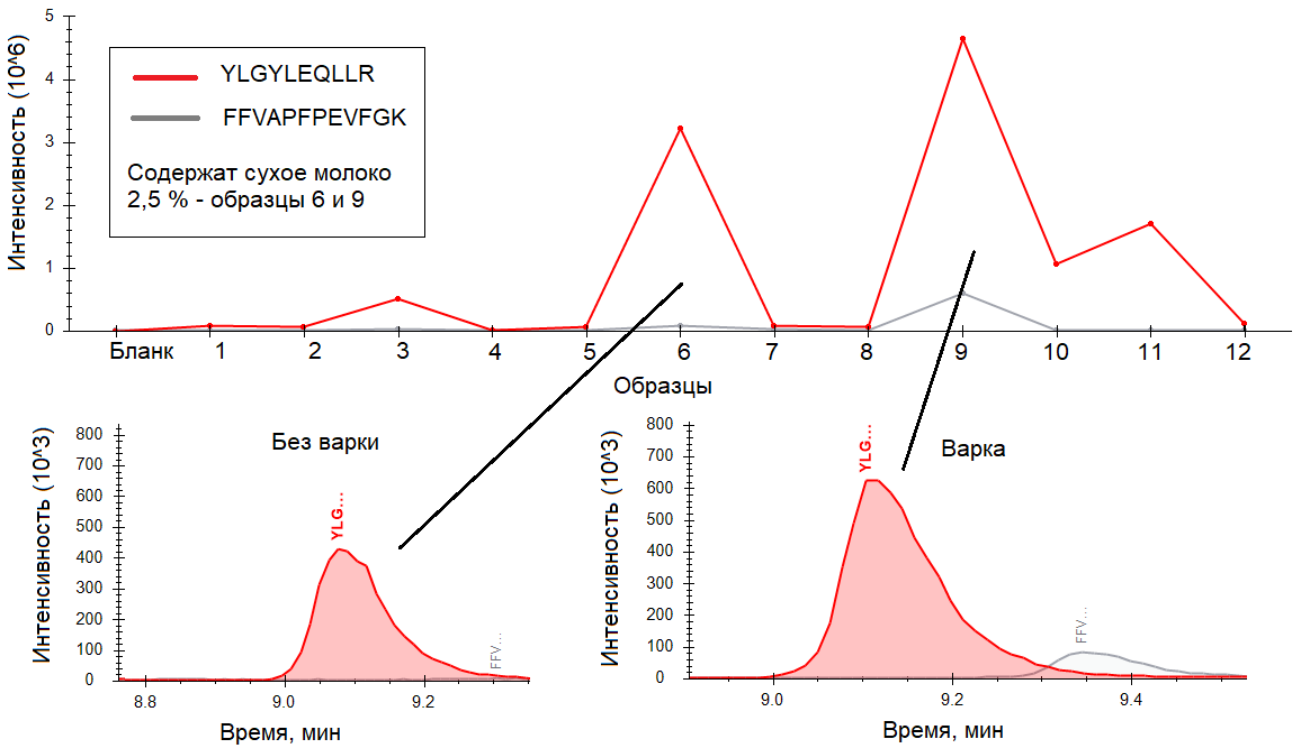

Рисунок 8 – Сравнение площадей по всем массам фрагментов для пептида YLGYLEQLLR и FFVAPFPEVFGK в исследуемых образцах.

3.3 Проверка селективности маркеров свинины по типу ткани

Целью данного этапа работы стало изучение состава мясных продуктов, содержащих, помимо мышечной, другие типы тканей: гладкая мускулатура внутренних органов (аорты) и сердечную мышцу. Необходимо было установить, присутствуют выбранные маркерные пептиды (таблица 2) для мышечной ткани свинины в других типах ткани для предотвращения намеренной подмены основного сырья другим типом ткани в составе готового термообработанного мясного продукта. В ходе анализа не удалось обнаружить ранее выявленные маркеры мышечной ткани не в одном другом типе ткани (рисунок 9). Это говорит о селективности выбранных маркеров для аутентификации мышечной ткани свинины, а именно пептиды SALAHAVQSSR и TLAFLFAER из миозина и LVVITAGAR из белка лактатдегидрогеназы, сигнала которых нет на хроматограммах для гладкой мускулатуры и сердечной мышцы. При использовании такого подхода производитель не сможет применять сырье более низкого качество от того же вида животного.

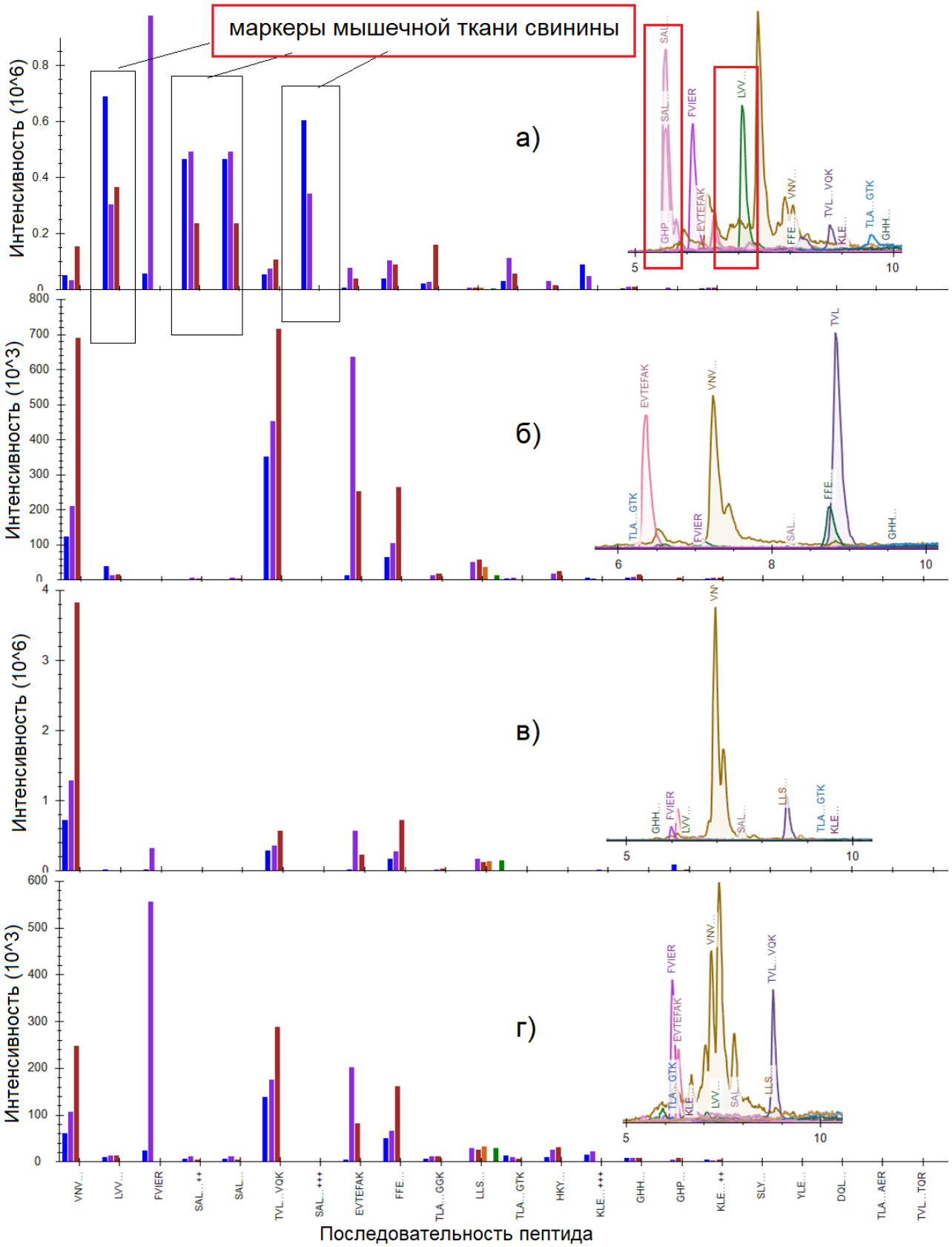

Рисунок 9 – Сравнение площадей маркерных пептидов свинины по всем SRM переходам для исследуемых образцов: а – рецептура 1 (таблица 2); б – гладкомышечная ткань свиных аорт; в – сердечной мышца свиная; г – паштет ЗС.

3.4 Разработка методики содержания мышечной ткани в мясном сырье

Была апробирована ЖХ-МС методика для обнаружения и полуколичественного определения мышечной ткани двух различных видов мяса (говядина и свинина) в сложной биологической матрице, такой как бесструктурные фарши. После выделения белков и расщепления их трипсином для количественного определения были выбраны видоспецифичные пептидные маркеры0 для каждого типа животного (таблица 3). Метод был апробирован на модельных образцах смеси мышечной ткани двух видов животных (образцов *m.l.Dorsi* свинины и говядины).

Таблица 3 – Оптимизированные параметры MRM для 7 пептидов свинины (*Sus scrofa*) и говядины (*Bos taurus)*.

Пептид	вид животного	Время удерживания (мин)	Материнский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	Энергия соударения
HPSDFGADAQAAMSK	*Bos taurus*	6,3	511,6	635,3; 507,3; 641,3	13,6
SNVSDAVAQSAR	*Bos taurus*	5,8	602,8	904,4; 702,4; 532,3	19,7
HPGDFGADAQGAMSK	*Sus scrofa*	6,8	496,9	621,3; 493,2	13,1
THVSEAVAQSTR	*Sus scrofa*	5,5	429,2	562,3; 491,3; 625,3	10,7
YLEFISDAIIHVLHAK	*Bos taurus*	5,4	623,7	796,9	17,7
NDMAAQYK	*Bos taurus*	8,2	470,7	711,3	15,6
YLEFISEAIIQVLQSK	*Sus scrofa*	6,1	627,7	815,5	17,8

Для выбора наиболее чувствительной ионной пары MRM для каждого пептида и включения в конечный мультиплексный метод MRM, были выбраны три наиболее интенсивные пары ионов MRM (определено прямым анализом ввода пробы) затем тестировали в условиях ВЭЖХ-МС анализа. Все три ионных перехода MRM для каждого пептида использовались для подтверждения идентичности. Это также позволило определить их соответствующие времена удерживания (рисунок 10). Целесообразно использовать только SRM, включающие только 2х зарядные *y-ионы* с получением дочерних ионов большей m/z, обеспечивающие максимальную величину аналитического сигнала (таблица 7)

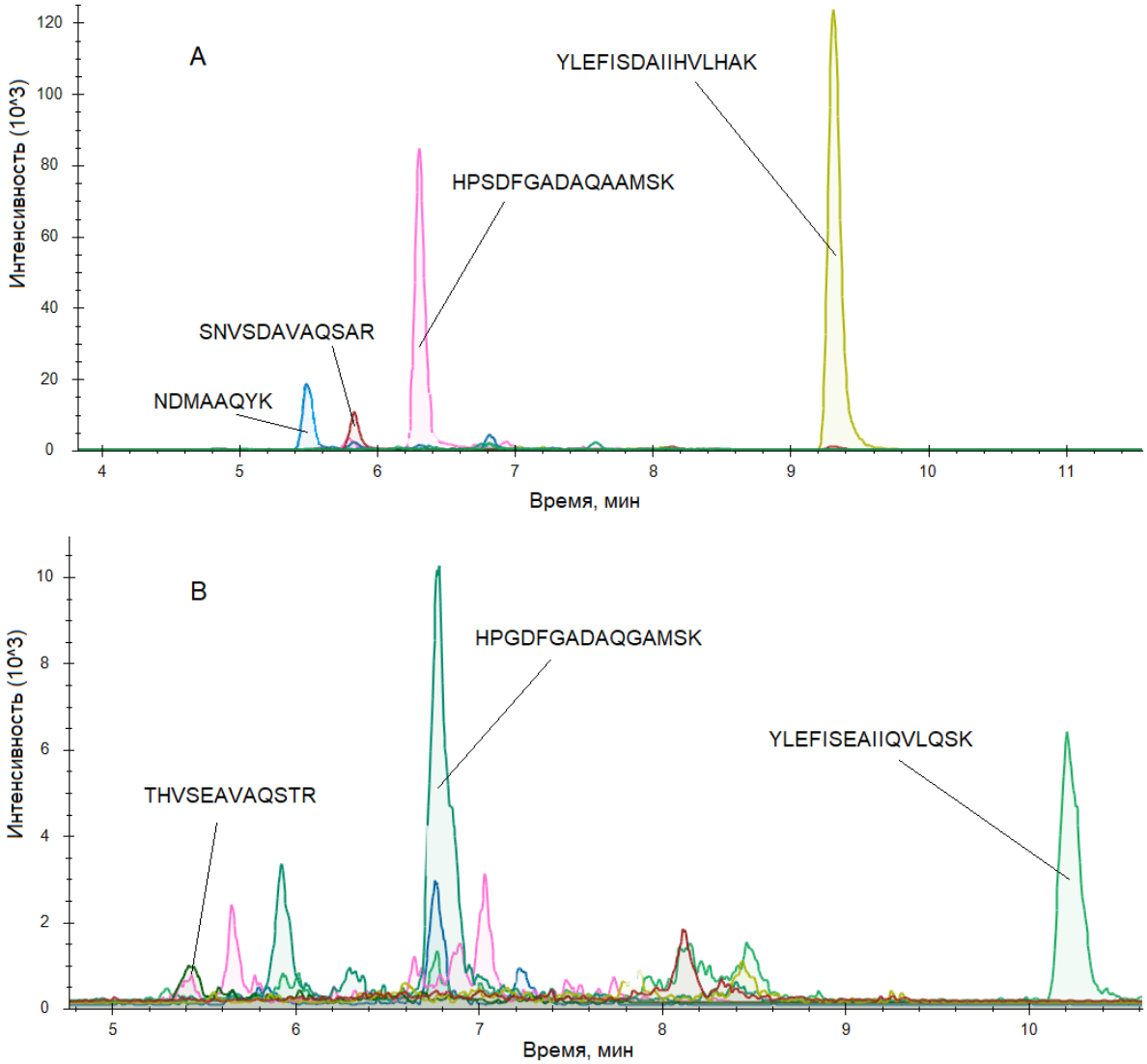

Рисунок 10 – Хроматограммы определения мышечной ткани основного мясного ингредиенты: А – говядина; В - свинина.

Чтобы максимизировать емкость аналита и пропускную способность метода мультиплексирования MRM, было сосредоточено внимание на минимизации количества используемых пар ионов MRM (рисунок 11). После выбора маркерных пептидов для каждого из исследуемых видов эти пептиды были проанализированы, с целью установления пределов обнаружения (LOD) и количественного определения метода (LOQ), а также линейность ответа при 5% (мас. %) содержании мышечной ткани говядины в смеси 95% (мас. %) свинины. Для этого в хроматограммах были интегрированы площади маркерных пептидов (сумма трех отслеживаемых переходов).

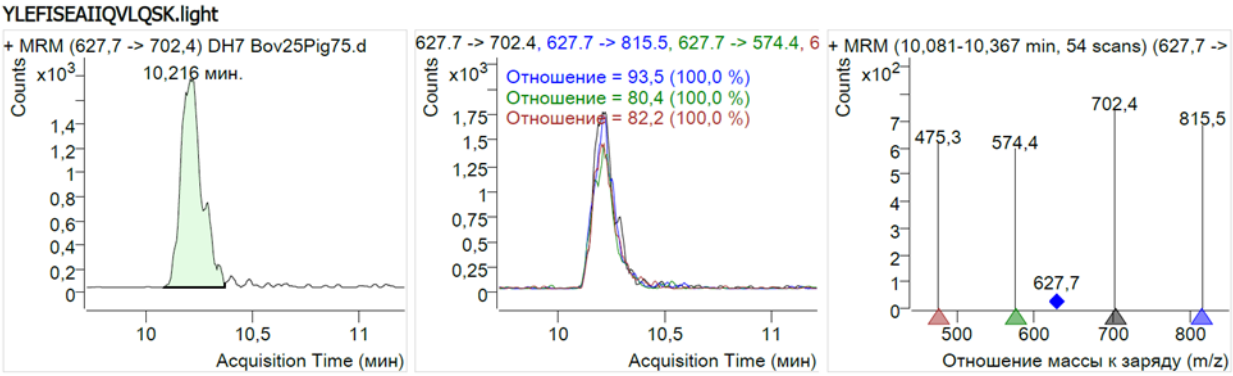

Рисунок 11 – Хроматограммы видоспецифического пептида **SNVSDAVAQSAR** говяжьей лактатдегидрогеназы.

Соотношение между площадью каждого маркерного пептида и площадью общего пептида было вычислено для нормализации данных и во избежание различий из-за возможных вариаций в эффективности экстракции белка, активности фермента и других факторов. Калибровочные кривые (рисунок 12), охватывают весь диапазон концентраций ВЭЖХ-МС анализа.

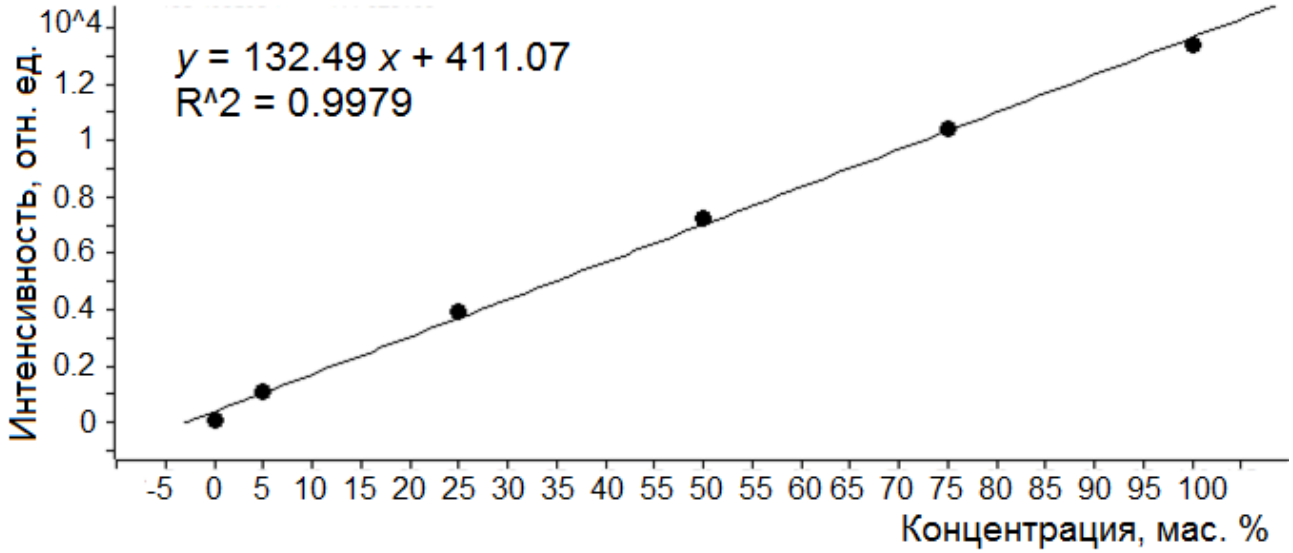

Рисунок 12 – Калибровочная кривая протеотипического пептида **SNVSDAVAQSAR** мышечной ткани говядины (белок –лактатдегидрогеназа).

Установлены метрологические характеристики метода: сходимость на модельных системах в пределах 25,0% ср. кв. отклонения (при $n = 3$). Хорошая линейность была установлена для говядины, в отличие от свинины (таблица 4). Линейный динамический диапазон MRM для 7-ми пептидов варьировался от 5% (мас. %) мышечной ткани до 100% (мас. %) в смеси с другим видом мяса (свинина, говядина). Пределы обнаружения видов в модельных образцах находились в

диапазоне 0,20–3,27% (мас. %), а пределы количественного определения – в диапазоне 0,61–9,91% (мас. %). Расчеты проводились в процентах от общего количества мяса.

Таблица 4 – Калибровочные кривые, пределы обнаружения и количественного определения для протеотипических пептидов.

Вид мяса	Пептид	Уравнение кривой	R2	LOD, % (мас. %)	LOQ, % (мас. %)
Говядина	HPSDFGADAQAAMSK	y = 4469,76 * x + 6559,33	R2=0,998	0,20	0,61
	SNVSDAVAQSAR	y = 132,49 * x + 411,07	R2=0,997	0,93	2,81
	YLEFISDAIIHVLHAK	y = 1314,94* x + 3544,25	R2=0,989	0,23	0,70
	NDMAAQYK	y = 8276,64 * x + 23568,42	R2=0,986	0,29	0,86
Свинина	HPGDFGADAQGAMSK	y =168,36 * x + 8040,57	R2=0,964	3,27	9,91
	THVSEAVAQSTR	y = 32,07 * x + 32,68	R2=0,999	1,10	3,33
	YLEFISEAIIQVLQSK	y = 157,26 * x + 73,15	R2=0,998	0,25	0,76

После того, как был установлен порог обнаружения метода для каждого вида мяса, несколько образцов с неизвестным составом были подвергнуты анализу по разработанному методу для идентификации сторонних компонентов мышечной ткани другого вида животного. Учитывая, что предложенный метод ВЭЖХ / ESI-MC / MC позволяет обнаружить подмес мяса другого вида животного, отсутствие ложноотрицательных результатов демонстрирует высокую чувствительность метода. Разработанный метод показал также высокую специфичность; ложноположительные результаты не выявлены, то есть при отсутствии определенного вида мяса образцы всегда давали результаты ниже LOD. В обобщенную мультиплексную методику анализа белковой фракции были добавлены ранее выбранные биомаркеры (таблица 5). Эта комплексная методология учитывала наиболее используемые виды в мясном секторе и в будущем способна применяться к реальным промышленным продуктам. Это имеет первостепенное значение при анализе сложных пищевых матриц как фарши,

которые являются основным сырьем для готовой продукции и наиболее подвержены фальсификации.

Таблица 5 – Показатели контроля качества разработанной мультиплексной методики для мясного сырья и готовых продуктов за один анализ.

Показатель	Биомаркер	Качественное определение	LOD, % (мас. %)	Диапазон определения, % (мас. %)	Коэф. . ст. откл.,%
М.ТК говядины	YLEFISDAIIHVLHAK (NDMAAQYK-подтверждающий) HPSDFGADAQAAMSK – фарши	да	0,2	0,6-100,0	7,4
М.ТК свинины	YLEFISEAIIQVLQSK (SALAHAVQSSR-подтверждающий)	да	0,3	0,7-100,0	5,2
М.ТК курицы	VAGAALPCAPAVK	да	-	1,0-100,0	-
Сухое молоко	FFVAPFPEVFGK	Да	-	0,3-100,0	-
	YLGYLEQLLR	Да		0,1-100,0	

В рамках текущей работы предоставляем полезный инструмент как для контролирующих органов (для оценки подлинности продукции), так и для пищевой промышленности (для мониторинга поставок сырья). Более того, успех применения этого метода к сложной пищевой матрице демонстрирует, как тот же самый подход может быть успешно применен к широкому спектру пищевых продуктов.

3.5. Экономическая эффективность

Результаты расчёта экономической эффективности (в ценах 2021 года) показали, что суммарные затраты на проведение аналитических исследований «Идентификационный анализ протеотипических пептидов для мясного сырья методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием» составили 1416,64 рублей с использованием измерения общего растворимого белка и дополнительной стадией очистки и 738,25 рублей без данных стадий. Расчет стоимости произведен для одного полноценного профилирования белкового состава на данный момент для 4 показателей и имеющий потенциально расширение до 15 показателей за один анализ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате биоинформационного поиска было выбрано более 100 уникальных пептидов, не содержащих аминокислоты, подверженных химической модификации.

2. Проведен сравнительный анализ 58-ми аминокислотных последовательностей. Определены лучшие протеотипические пептиды для идентификации и надежного детектирования мышечной ткани основного мясного сырья и белковых ингредиентов: говядины (YLEFISDAIIHVLHAK, NDMAAQYK), свинины (YLEFISEAIIQVLQSK, SALAHAVQSSR), мяса кур (VAGAALPCAPAVK), сухого молока (FFVAPFPEVFGK, YLGYLEQLLR), обладающих термостабильностью и специфичностью.

3. Установлена селективность протеотипических пептидов на примере сравнения различных тканей свинины.

4. Разработана ВЭЖХ-МС/МС методика полуколичественной оценки мышечной ткани свинины и говядины в сложной пищевой матрице. Установлены метрологические характеристики: сходимость на модельных системах в пределах 25,0% ср. кв. отклонения (при n = 3). Предел обнаружения методики – ≥0,3% (мас. %). Предел количественного определения ≥0,9 % мас. Диапазон количественного определения от 0,9-100,0% (мас. %) с точностью в пределах 25,0% ср. кв. отклонения. Чувствительность методики позволят провести различие между случайным загрязнением ($< 1{,}0$ % (мас. %)) и сознательным внесением незаявленных ингредиентов ($> 1{,}0$ % (мас. %)).

5. Приложение по идентификации мышечной ткани включено в методические рекомендации «Методика измерений массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной продукции, выработанной по национальным и межгосударственным стандартам (за исключением консервов) (№ 241.0067/RA.RU.311866/2021), методом флуоресценции для детектирования продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени».

Список работ, опубликованных по материалам диссертации:

Статьи в международных базах данных и рецензируемых изданиях:

1. Quantitative Identification of Muscle Tissue by Means of Biomarker Peptides by Using Method of Multiple Reaction Monitoring / Kulikovskii A.V., Vostrikova N.L., Chernukha I.M., **Khvostov D.V.** // J.Oriental of Chimistry. – 2019. – V. 35, – №4. – P. 1327-1331 http://dx.doi.org/10.13005/ojc/350411
2. Comparison of heat-stable peptides using a multiple-reaction monitoring method to identify beef muscle tissue / **Khvostov D.V.**, Vostrikova N.L., Chernukha I.M. // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2020. – T. 14. – P. 149-155 https://doi.org/10.5219/1317
3. Detection of the best peptide markers in the tissues hearts and aorta of pork using a multiple-reaction monitoring method to confirm meat authentication. tissue / **Khvostov D.V.**, Vostrikova N.L., Chernukha I.M. // Journal of Animal Science. – 2020. – V. 98, – № 4. – P. 362-363 https://doi.org/10.1093/jas/skaa278.636
4. Идентификация количества мышечной ткани по биомаркерным пептидам при помощи квадрупульной хромато-масспектрометрии / **Хвостов Д.В.**, Вострикова Н.Л., Чернуха И.М., Куликовский А.В. // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2019. – Т. 161. – №. 3. – С. 490-499 https://doi.org/10.26907/2542-064X
5. Идентификация и количественное определение мышечной ткани на основе контроля протеотипических пептидов с использованием метода мониторинга заданных реакций / **Хвостов Д.В.**, Вострикова Н.Л., Зверева Е.А, Жердев А.В., Курзова А.А. // Журнал Аналитика и контроль. – 2019. – Т. 23. – №. 4. – С. 580-586. http://dx.doi.org/10.15826/analitika.2019.23.4.012

Статьи в изданиях из перечня рецензируемых ВАК:

6. Методологические аспекты идентификации тканеспецифичных белков и пептидов, формирующих корригирующие свойства инновационных мясных продуктов / Вострикова Н. Л., Чернуха И. М., **Хвостов Д. В.** // Теория и практика переработки мяса. – 2018. – Т. 3. – №. 3. – С. 36-55. https://doi.org/10.21323/2414-438X-2018-3-3-36-55
7. Methods of identification of muscle tissue in meat products. prerequisites for creating a multi–level control system / Chernukha I.M., Vostrikova N.L., **Khvostov D.V.**, et al. // Theory and practice of meat processing. – 2019. – V. 3, – №4. – P. 32-40. https://doi.org/10.21323/2414-438X-2019-4-3-32-40

Статьи в сборниках научных трудов, материалов конференции:

8. Количественная идентификация мышечной ткани при помощи биомаркерных пептидов с целью подтверждения аутентичности мясной продукции / **Хвостов Д.В.** // В сборнике: материалы X Евразийского экономического форума молодежи. Ответственный за выпуск Я. П. Силин, Р. В. Краснов, Е. Б. Дворядкина. – 2019. – Т. 3. – С. 209-211.
9. Quantitative identification of muscle tissue by means of biomarker peptides for meat product authenticity confirmation / **Khvostov D.V.**, Vostrikova N.L., Chernukha I.M. // Book of abstracts «9th International Symposium on Recent advances in food analysis», Prague, Czech Republic. Edited by J. Pulkrabova [et al]. – 2019. – P. 321. ISBN 978-80-7592-055-3
10. Development of immunoassays for troponin i to control a content and a source of raw meat in products of its processing / Zvereva E.A., Popravko D.S., **Khvostov D.V.**, Vostrikova N.L., Zherdev A.V., Chernukha I.M., Dzantiev B.B.// Book of abstracts «9th International Symposium on Recent advances in food analysis», Prague, Czech Republic. Edited by J. Pulkrabova [et al]. – 2019. – P. 258. ISBN 978-80-7592-055-3
11. Сравнение биомаркерных пептидов для идентификация мышечной ткани свинины с использованием метода мониторинга множественных реакций / **Хвостов Д.В.**, Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. // В сборнике: Современная биотехнология: актуальные вопросы, инновации и достижения: Сборник тезисов Всероссийской с международным участием онлайнконференции. Под общ. ред. А. Ю. Просекова; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет». – Кемерово, – 2020. – С 171-173.
12. Изучение пептидных биомаркеров для аутентификации сырья и специальных свойств пищевых продуктов / **Хвостов Д.В.** // В сборнике: Проблемы биологической безопасности жизнедеятельности в современном мире: вызовы, состояние и перспективы. XIV международный биотехнологический Форум «РосБиоТех-2020». Ответственные за выпуск: Чернуха И.М., Сергеева А.В., Асланова М.А., Дыдыкин А.С. – 2020. – С. 152.
13. Принцип идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белково-пептидной природы в мышечной ткани животных / Вострикова Н.Л., Чернуха И.М., **Хвостов Д.В.** // В сборнике материалов международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2020. – С. 383-386. УДК: 637.5.072/616-0