На правах рукописи

ВОСТРИКОВА НАТАЛЬЯ ЛЕОНИДОВНА

Разработка научно-практической модели выявления и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы в мясной продукции

Специальность 05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств
Специальность 05.18.07 – биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «ФНЦ пищевых систем имени В. М. Горбатова» РАН.

Научный консультант: доктор технических наук, профессор, чл.-корр. РАН, **Чернуха Ирина Михайловна**

Официальные оппоненты:

Гуринович Галина Васильевна–доктор технических наук, профессор ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», заведующий кафедрой «Технология мяса и мясных продуктов».

Серба Елена Михайловна–доктор биологических наук, профессор РАН, доцент, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал ФГОБУН Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, заместитель директора института по научной работе

Емельянов Сергей Александрович– доктор технических наук, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», Институт живые системы, профессор кафедры Прикладной биотехнологии

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I»

Защита состоится «__»_____2019 года в__часов__минут на заседании диссертационного совета Д 006.021.02 при ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им.В. М. Горбатова» РАН по адресу: 109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года.

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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Протеомика является перспективным подходом (междисциплинарным направлением) для изучения механизмов, лежащих в основе различных ткане- и видоспецифичных свойств мяса.

Задача протеомики направленная на поиск и идентификацию белковых маркеров, обычно называемых биомаркерами, в настоящее имеет большое значение, поскольку это поможет изучать, прогнозировать и управлять большим диапазоном характеристик, которые используются при производстве и переработке мяса. Формирование интегрированного научного и технологического базиса для использования комплекса протеомных и других постгеномных и геномных технологий в сочетании с применением методов масс-спектрометрии изучения биотканей, а также иного биологического материала, позволяет детально характеризовать отдельные субпротеомы и маркерные вещества.

В настоящее время выявление биомаркеров животноводческого сырья играет важную роль, поскольку они могут использоваться для расширения диапазона их применения в мясных технологиях как для изучения качественных и количественных изменений свойств мясного сырья при переработке, так и для его идентификации в готовых мясных продуктах.

На сегодняшний день использование протеомики в оценке качества и безопасности мясного сырья и продуктов животного происхождения находится на ранней стадии, о чем говорит относительно небольшое количество публикаций, затрагивающих данную тематику. Задав в базе данных e-library ключевые слова «proteomics» и «muscle», выявляется 1021 публикация, в основном, по мышечной ткани человека, а по ключевым словам «протеомика», «мышца», «мясо» всего 33 публикаций из 28498899 источников, из которых 25 – это публикации за 2013-2017гг, а первая публикация, отвечающая ключевым словам, датируется 2003 годом. В базе данных «PubMed» по ключевым словам «proteomics», «muscle» и «meat» за период 2013-2017гг выявлено 114 публикаций, что свидетельствует о том, что интерес к изучению протеома мясного сырья еще только проявляется.

Все больший интерес вызывает использование геномики, протеомики и метаболомики в науке о мясе для получения полезной информации о различных характеристиках мяса и освещения молекулярных механизмов, лежащих в основе вариаций в этих характеристиках. Качество мяса тесно связано с биологическими особенностями животного. При этом становится очевидным, что качественные характеристики мяса, например, нежность, водосвязывающая способность, фракционный состав, вкусоароматическая составляющая и пр. – это сложные мультикомпонентные показатели, зависящие от целого ряда функционально-технологических факторов. Таким образом, очевидно, что системное изучение с использованием междисциплинарных подходов, многочисленных генов и белков животноводческого сырья, расширит научную и технологическую базу и обеспечит получение новых физико-химических, функционально-технологических показателей мясного сырья, а также приведет к разработке

комплексной системы (технологии) переработки его в мясные продукты с высокими потребительскими характеристиками. Особый интерес при этом могут иметь исследования продуктов для персонифицированного питания и/или с длительными сроками хранения, адаптированные к современным физиологическим нормам питания.

Вместе с тем, вопросы систематизации и интеграции научных и методических решений для идентификации тканеспецифичных веществ белковой природы при производстве мясных продуктов, пока недостаточно проработаны и требуют дальнейшего изучения. Прогнозирование функционально-технологических свойств мясных продуктов представляется особенно актуальным, в настоящее время при углублении изучения автолитических процессов мясного сырья на фоне изменения генотипа животных и кормовой базы рационов питания, а также пищевой предпочтительности потребителя к натуральному мясу, продуктам определённого состава и характеристик. Актуально и практическое применение данного методологического подхода для создания современных методов контроля состава и свойств мясной продукции на основе анализа видо- и/или тканеспецифических мышечных белков, так и для выявления отклонений от технологических рецептур. Очевидно, что подобные работы в соответствии с планом Стратегии научно-технологического развития РФ в части эффективной переработки сельскохозяйственной продукции, созданию безопасных, в том числе функциональных, продуктов питания, имеют социально-ориентированное значение для улучшения их качества.

Степень разработанности. Научные и практические аспекты протеомного изучения белков человека и животных описаны в работах Westermeier R. et al. 2008; Picard B. et al. 2015; Zhang R. et al. 2015; Righetti P.G. et al. 2011; Шишкина С.С. с соавт. 2011,2016; Sun, H. et al. 2014 и др. Идентификация белков в некоторых видах мышц сельскохозяйственных животных методами масс-спектрометрии представлена в публикациях: Ковалева М.А., Б.Б. Дзантиев 2015; K. Hoffmann, D'Ambrosio C., Arena S., Talamo F., Ledda L., Renzone G., Ferrara L., а поиск потенциальных биомаркеров мышечной ткани: Y.M Choi et al. 2007; O. Lars Dragsted 2010; I. Surowiec et al. 2011; Montowska M. et al. 2016,2017; Gui-Ji Wang et al. 2018. и др.

Выявлением функциональных пептидов и оценкой биокоррегирующих свойств мясного сырья занимались: Melody J.L.; M. Shibata; Lonergan S.M., Rowe L.J, Arihara K.; Чернуха И.М.; Шишкин С.С; Ковалев Л.И., Машенцева Н.Г. и др.

Проводимые ранее научные изыскания сосредоточены либо в рамках одного направления (изучение степени созревания мяса, выявление фракционного состава мышечных белков, изучение физико-химических показателей, пищевой или биологической ценности), либо были направлены на изучение отдельных этапов производства мясной продукции (производство, обращение, контроль качества), в этих случаях применялась оценка на основе монометодологий (титриметрия, гравиметрия, потенциометрия, 1Д электрофорез, 2Д электрофорез, хроматография). Очевидно, что протеомные исследования, идентификации биохимических изменений мясного сырья под действием технологических

факторов все еще недостаточны изучены. Отсутствует системность и методологическая основа протеомных исследований и оценка возможностей протеомики для изучения механизмов трансформации белков, обусловливающих качественные и функциональные характеристики, а также безопасность мясной продукции.

Цель и задачи исследований. Разработать научно-практические основы системной стратегии и интегрированную модель действий по выявлению, изучению и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы животного происхождения для подтверждения состава и аутентичности мясной продукции.

Для выполнения цели были поставлены **задачи**:

- Систематизировать и адаптировать существующие методологические подходы использования протеомных и хроматографических методов для анализа белковых компонентов.
- Разработать научно-практические основы применения системной протеомной стратегии идентификации белкового состава мяса и оценки аутентичности мясной продукции.
- Провести экспериментальные исследования и идентифицировать мышечные белки сельскохозяйственных (говядина, свинина, конина, верблюжатина) животных и птицы (курица, индейка), а также белки, входящие в состав ингредиентов, используемых в мясном производстве, с целью получения белкового паттерна.
- Обосновать и экспериментально подтвердить наличие ткане- и видоспецифичных различий белков животного происхождения.
- Установить характер изменения мышечных белков свинины при созревании мяса с учетом принадлежности к различным группам качества. Провести сравнительное изучение характера изменений пептидного профиля говядины при анаэробном и аэробном хранении.
- Установить перечень белковых биомаркеров для оценки аутентичности термообработанной мясной продукции (на примере вареных колбасных изделий), провести оценку содержания видоспецифичных мышечных тканей с учетом наличия белковых ингредиентов не мышечного происхождения и разработать методики качественного и количественного определения мышечных белков.
- Разработать методику построения протеомных карт выявленных белков мяса и готовой мясной продукции (на примере вареных колбасных изделий), провести анализ и сформировать програмный комплекс – атлас «Протеомные карты мяса и мясных продуктов».
- Провести научно-производственную апробацию результатов исследований и оценку экономической эффективности внедряемых методов.

Научная новизна.

1.Формализованы подходы и требования к методологии использования современных инструментальных методов анализа мяса и компонентного состава мясной продукции.

2. Научно обоснована модель и разработан алгоритм изучения протеома мышечных и не мышечных белков в сырье, используемом в мясном производстве.

3. Идентифицированы белки мышечной ткани сельскохозяйственных животных и птицы, испрользуемых в качестве основного сырья. Впервые при идентификации протеома мышечных белков в многокомпонентной мясной продукции применен прием коэлектрофореза, позволивший разделить типичные видовые белки животных и птицы с одинаковой молекулярной массой.

4. Определены специфичные биомаркеры мышечной ткани в термообработанной мясной продукции, позволившие положить основу новой методологии количественной идентификации мышечного белка при помощи метода мониторинга множественной реакции (MRM-метода).

5. Впервые систематизированы и получены новые протеомные карты белков сельскохозяйственных животных, птицы и готовых мясных продуктов, на основании которых разработан програмный комплекс – атлас «Протеомные карты мяса и мясных продуктов».

6. Разработана методика идентификации тканеспецифичных веществ белковой природы при помощи времяпролетной масс-спектрометрии и оценка аутентичности мясного продукта по его протеомному профилю, новизна которой была подтверждена патентом.

7. Научно-обоснованы характеристики базы данных протеомных профилей основных белков, пептидов и биомаркеров ткане-, видоспецифичности и аутентичности мясной продукции.

8. Оригинальность и научная обоснованность подходов отражена в 57 публикациях, из которых 6 опубликованы в рецензируемых международных базах данных (Scopus и WoS).

Теоретическая и практическая значимость исследований.

Результаты работы представляют собой разработанный комплексный подход по выявлению и идентификации видо- и тканеспецифичных веществ белковой природы при контроле мясного продукта. Предложена протеомная стратегия идентификации белкового состава мясной продукции. Разработан порядок пробоподготовки для максимального выделения маркерных белков из термообработанных мясных продуктов. С использованием биоинформатики осуществлен анализ и количественная оценка протеома мышечной ткани говядины, свинины, конины, верблюжатины, курицы и индейки.

Разработанные методы позволяют определять видовую и тканевую принадлежность мяса и количественно определять в мясной продукции белковые компоненты, а также выявлять наличие ингредиентов растительного и животного происхождения в продуктах, подвергшихся термической обработке.

Разработанный программный комплекс – атлас «Протеомные карты мяса и мясных продуктов», содержащий электрофореграммы и денситограммы фракционного состава можно применять для идентификации видовой принадлежности мышечной ткани, а также для выявления не заявленных

ингредиентов в готовой продукции. Результаты работы могут быть внедрены в практику производственных и аккредитованных лабораторий при входном контроле сырья и ингредиентов, а также в учебный процесс при подготовке бакалавров и магистров ветеринарного, биотехнологического и пищевого направления.

На основании результатов исследований разработаны и валидированы методики измерений МИ –1/2016 Ф «Определение качественного содержания белков методом 1D – электрофореза» и МИ –2/2018 Ф «Определение количественного содержания мясных белков методом 2Д – электрофореза», получены 4 патента.

Методика апробирована в условиях лабораторий Биомедицинских исследований ФИЦ Биотехнологии РАН НИУ МГТУ им.Н.Э.Баумана и лаборатории биоаналитических исследований ФГБУН НЦБМГ ФМБА России. Результаты работы используются при проведении лекционных и практических занятий в рамках повышения квалификации химиков-аналитиков в Учебном центре ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН, АНО ДПО «МТИМП», при подготовке дипломных работ на базовой кафедре ФГБОУ ВО МГУТУ им. К.Г. Разумовского, на кафедре управления качеством и товароведение продукции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Положения, выносимые на защиту.

1. Научно-обоснованные подходы к использованию протеомных методов анализа белкового состава мяса и мясной продукции.
2. Методология протеомных исследований мышечных белков. Выявление белковых маркеров ткане- и видоспецифичности мяса и аутентичности мясной продукции.
3. Результаты изучения трансформационных изменений протеома мышечной ткани.
4. Структурная модель атласа «Протеомные карты мяса и мясных продуктов».

Апробация результатов исследования. Основные результаты работы доложены и представлены на международных и всероссийских научных, научно-практических конференциях, форумах, симпозиумах, в том числе: 55, 58, 59, 61 и 63 International Congress of Meat Science and Technology (Копенгаген, Дания 2009; Торонто, Канада, 2012; Измир, Турция, 2013; Клермон Ферран, Франция, 2015; Корк, Ирландия, 2017 гг.); международная научно-практ. конф. посвященная памяти В.М. Горбатова (Москва, 2011; 2012; 2013; 2014; 2016, 2017); международная научно-практ. конф. «Пути интенсификации производства и переработки сельскохозяйственной продукции в современных условиях» (Волгоград, 2012; 2014); международная научно-практ. конф. «Экологические, генетические, биотехнологические проблемы и их решение при производстве и переработке продукции животноводства» (Волгоград, 2017); всеросс. научно-практ. конф. «Инновационные исследования и разработки для научного обеспечения производства и хранения экологически безопасной сельскохозяйственной и пищевой продукции «(Краснодар, 2013); 6th Internatinal

Symposium on Recent advances in food analysis (Czech Republic, 2013); международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2016); конференция «Необратимые процессы в природе и технике» (Москва, 2017); IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 85 (Serbia, 2017); научно-практический семинар «Совершенствование работы по контролю качества и безопасности мясной и молочной продукции» (Беларусь, 2017, 2018); международный симпозиум «Инновации в пищевой биотехнологии» (Кемерово, 2018); международная научно-практ. конф. «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2018). Практические аспекты применения разработанных методологий и алгоритма аутентичности мясного сырья использованы в рамках работ по грантам различных ведомств (Грант РФФИ ГК № 14.512.11.0038, 2013-2014; Грант РНФ №16-16-10073, 2016-2018; международный проект с Р.Казахстан, 2016-2018 гг.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 57 научных работ, в том числе одна монография, одно учебное пособие, 20 статей входящих в перечень ВАК Министерства образования и науки РФ, а также 6 статей в изданиях, рецензируемых в международных базах данных (Scopus и WoS), 4 патента.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 304 страницах печатного текста, включает 25 таблиц, 70 рисунков, 269 литературных источников отечественных и зарубежных авторов, 12 приложений. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, выводы и предложения производству.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Глава 1. Аналитический обзор научно-технической литературы. Обобщены научные исследования отечественных и зарубежных ученых по теме работы: систематизированы существующие методы и подходы по подтверждению соответствия продукции и выявления признаков фальсификации пищевых продуктов; рассмотрены потенциальные возможности протеомных методов и технологий для изучения динамики и механизмов специфических изменений протеома мышечной ткани под действием экзогенных и эндогенных факторов; качества и состава мяса и мясных продуктов; проанализированы возможности использования протеомных баз данных как эффективных инструментов для поиска белковых маркеров.

Глава 2. Методология и методы экспериментальных исследований.

В соответствии с целью работы объектами исследований служили: *m.L. Dorsi*: свинины, говядины, конины, верблюжатины; грудные мышцы птицы (курица, индейка) охлажденные через 24 ч после убоя; модельные фарши из *m.L. Dorsi* животных и грудных мышц птицы в сочетании 1:1; *m.L. Dorsi* говядины, упакованной в вакуум после 60 мин убоя и хранившейся в течение 48, 96 и 168 часов при t=2±2°С, хранение вскрытой упаковки при t=2±2°С до 240 ч, *m.L. Dorsi*

свинины группы качества: PSE, DFD, NOR в период созревания хранившейся при t=2±2°С. Опытные партии мясной продукции изготавливали на ОАО «Губкинский мясокомбинат» и МПЗ «Сафа», а также на экспериментальном производстве Алматинского технологического университета (Республика Казахстан), в соответствии с ГОСТ Р 52196-2011 и ГОСТ 33673-2015, а также обирали из розничной сети (различных производителей), в том числе выработанные по ТУ.

Для изучения протеомных профилей мышечных белков был использован подход, включающий как традиционные протеомные технологии – электрофоретическое разделение, так и модификации данных методов, масс-спектрометрическую идентификацию отдельных электрофоретических фракций и биоинформационный анализ.

В качестве основных протеомных методологий применяли одномерный (1Д) и двумерный электрофорез (2Д) по O`Farrell с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE) и иммобилиновом (IPG-PAGE) градиентах pH; детекцию белков осуществляли на гелевых пластинах окрашиванием Кумасси R-250, азотнокислым серебром, коллоидным Кумасси G-250.

Для проведения компьютерной денситометрии использовали, находившиеся во влажном состоянии гели. Их полные цифровые изображения и/или изображения отдельных фрагментов получали с помощью сканирования на сканере в режиме: разрешение 300 dpi, 48 bit Color, с сохранением результатов в формате -.TIFF. Цифровые изображения редактировали в графическом редакторе. Расчет содержание белков проводили с помощью программного обеспечения ImageMaster 2D Platinum.

Идентификацию белковых фракций на двумерных электрофореграммах (2ДЭ) осуществляли после трипсинолиза методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex («Bruker», Германия) в диапазоне масс 500-8000 Да. Анализ полученных масс-спектров триптических пептидов выполняли с помощью программы Mascot, («Matrix Science», США), с точностью определения массы MH+ равной 0.01%, осуществляя поиск по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Отдельные белки и пептиды определяли ручной обработкой путем сравнения аминокислотных последовательностей при белковом сиквенсе. Работа выполнена на оборудовании ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН.

При сравнительном анализе протеомных профилей представленных образцов использовали модули «Белки скелетной мышцы коров (*Bos taurus*)», «Белки скелетной мышцы свиньи (*Sus scrofa*)», «Белки скелетной мышцы лошади *Equus caballus*)» и «Белки скелетной мышцы верблюда (*Camelus bactrianus*)» многоуровневой базы данных «Протеомика мышечных органов». Птицу идентифицировали дополнительно по базам данных NCBI.

При выполнении работы применялись так же и общепринятые методы исследований, в том числе органолептические, физические, химические, хроматографические. Исследования проводились в не менее чем пятикратной повторности с использованием современных методик сбора и обработки

экспериментальных данных. Апробация методических разработок проведена в аккредитованных лабораториях на сертифицированном оборудовании.

Основные этапы работы проводились на базе ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем имени В. М. Горбатова» РАН.

Блок-схема исследований представлена на рисунке 1.

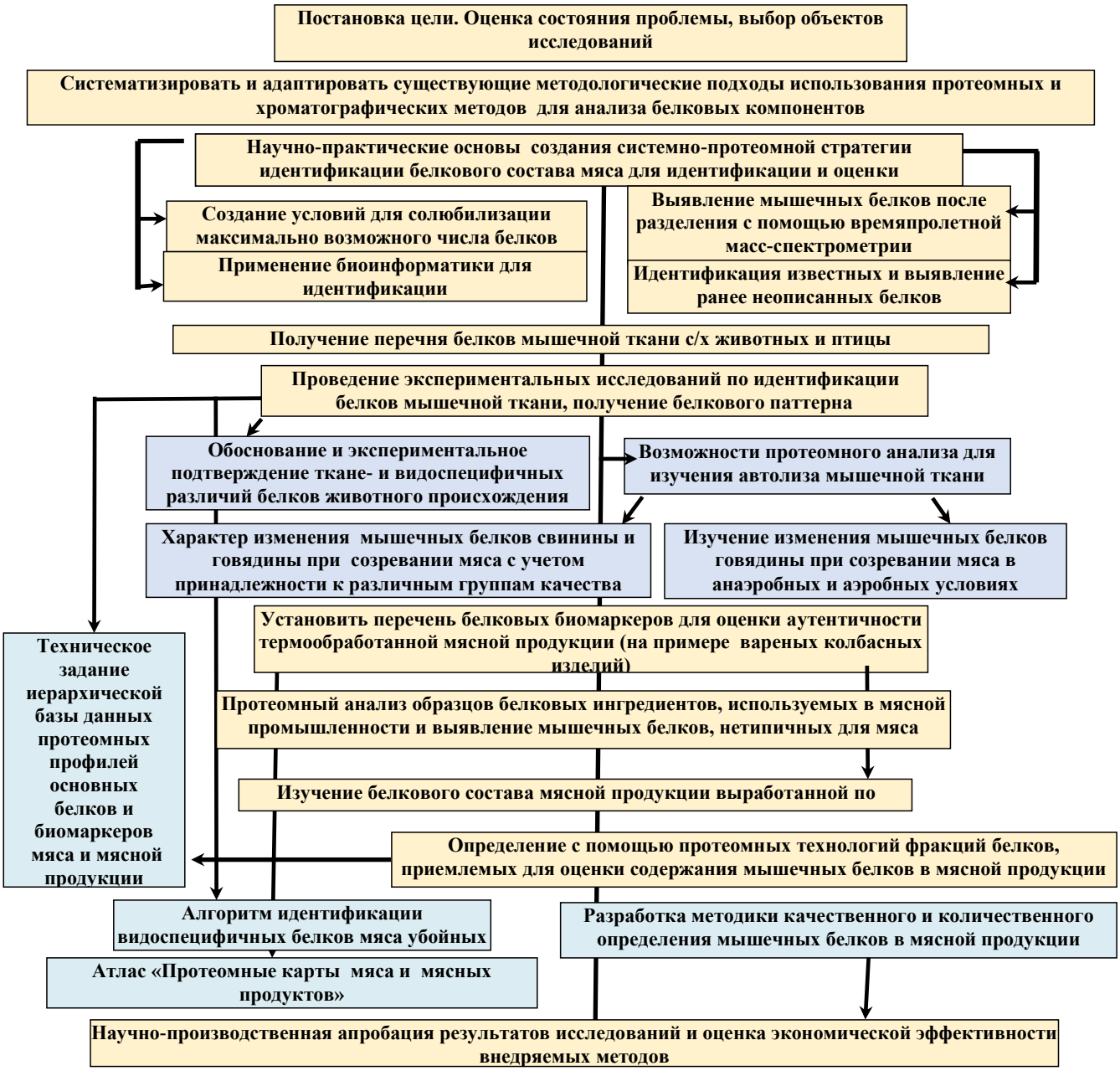
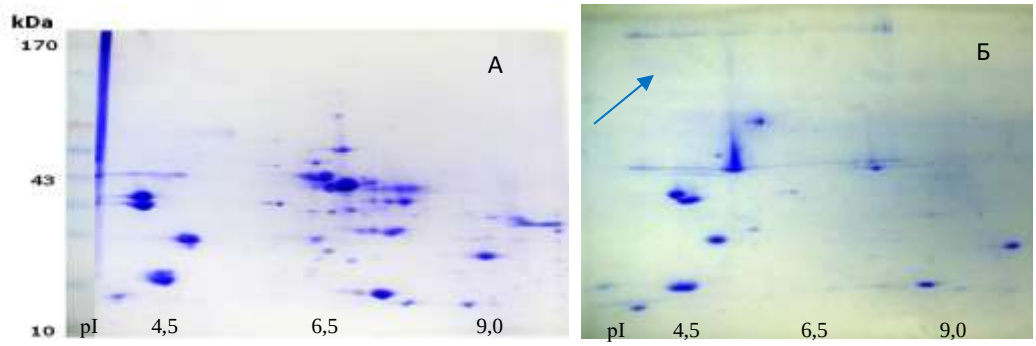


Рисунок 1 – Блок-схема исследований.

Глава 3. Модификация существующих подходов к методологии применения протеомных методов для анализа мышечных белков

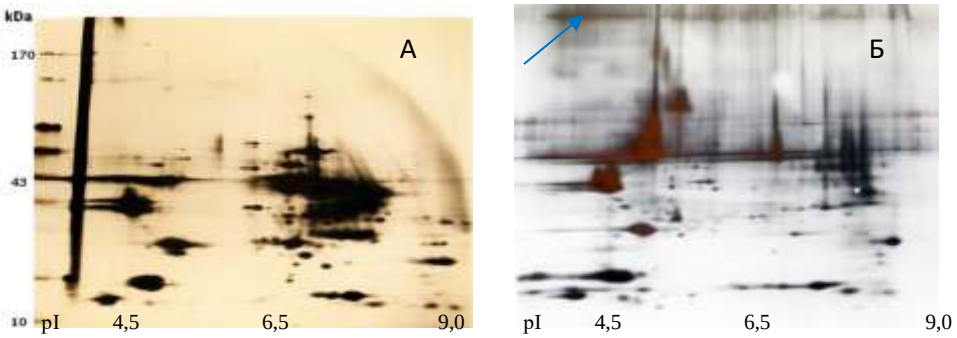
На первом этапе при модификации классических подходов электрофоретического разделения белков и для усиления разрешения протеомного анализа проводилось многоступенчатое префракционирование мышечных белков для солюбилизации максимального их числа. Модификация

методики префракционирования образцов позволила получить, по крайней мере, два центрифугата, обладающих принципиально различными протеомными профилями, что повысило в итоге эффективность последующего анализа мышечных белков. Это особенно важно при электрофоретическом разделении денатурированных в процессе термообработки белков, что особенно актуально при изучении готовой мясной продукции. Для идентификации максимального числа белков, даже с низким содержанием их в пробе были применены разные методы детекции белков. В частности, окрашивание нитратом серебра – черно-белое окрашивание, в отличие от окрашивания Кумасси R-250 (синее), приводило к определенному увеличению количества детектируемых фракций. При окрашивании 2ДЭ белков, полученных из опытных образцов (*m.l.Dorsi* свинины) Кумасси R-250 и нитратом серебра сохранялась закономерность расположения белковых фракций, а при использовании амфолинового градиента выявлялось существенно большее количество фракций – до 70 при окрашивании нитратом серебра, против окрашивания Кумасси R-250 (рисунок 2А, рисунок 3А). Однако, при окрашивании Кумасси R-250, вырезание и трипсинолиз из геля проходит более качественно и в полном объеме, в отличие от окрашивания серебром. Как видно из приведенных данных так же была необходима отработка режимов фракционирования белков в так называемом узком градиенте pH (4-6), такая модификация 2Д-ЭФ позволила исключить эффект наложения некоторых «мажорных» белков семейств тропомиозина/актина мясного сырья от разных видов животных или разных типов тканей.



А - модификация IEF-PAGE;
Б - модификация IPG-PAGE.

Рисунок 2 – 2ДЭ белков опытного образца, окраска Кумасси R-250.



А - модификация IEF-PAGE;
Б - модификация IPG-PAGE.

Рисунок 3 – 2ДЭ белков опытного образца окраска нитратом серебра.

В целом, как видно из рисунков 2 и 3, выявлены фракции белков в диапазоне молекулярных масс (Мм) от 10 до 200 кДа и изоэлектрических точек (pI) от 4,6 до 10,0 ед. Однако, модификация IPG-PAGE дала лучшее разрешение при фракционировании белков с 4,5≤ pI ≥8,70, включая белки с Мм >170 кДа (последние показаны синей стрелкой). При этом модификация с IEF-PAGE способствовала к выявлению белков не только с pI ≥4,5, но и белков с pI >8,70.

Свойства белков определяются присутствием на их поверхности положительно и отрицательно заряженных аминокислотных групп, что в свою очередь определяет суммарный заряд белка. Известно, что от суммарного заряда белка зависит величина его изоэлектрической точки. С целью изменить электрический заряд макромолекул путем модификации pH буфера и посредством добавления в него денатурирующих агентов, были применены IEF-PAGE и IPG-PAGE для выявления белков в широком диапазоне - градиентах pH 3-10. На рисунке 4 представлены результаты 2ДЭ, полученные при фракционировании этими модификациями. При сравнении можно отметить, что обе модификации выявляли примерно одинаковое расположение фракций, принадлежащих актинам, тропомиозинам и миозиновым легким цепям (МЛЦ). При этом количественная представленность актина при использовании IPG-PAGE, была существенно большей, по сравнению с аналогичной фракцией, полученной при IEF-PAGE. По-видимому, причиной этого различия стала стартовая агрегация белков (рисунок 4А).

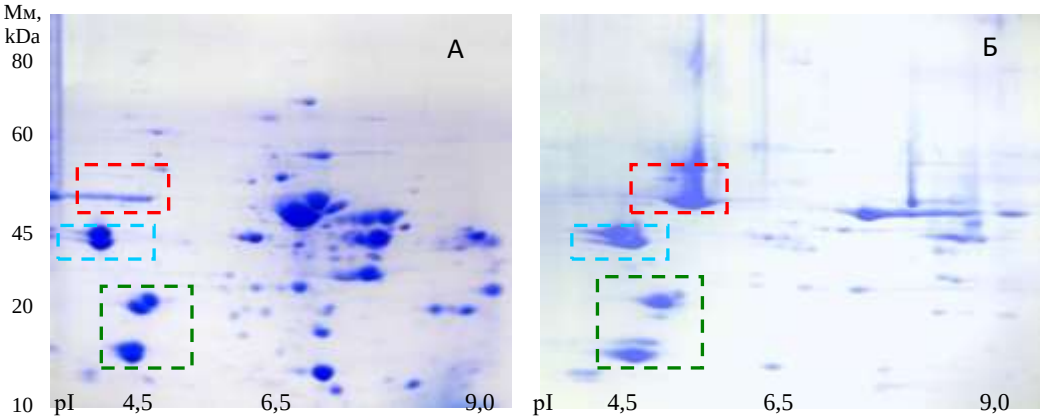
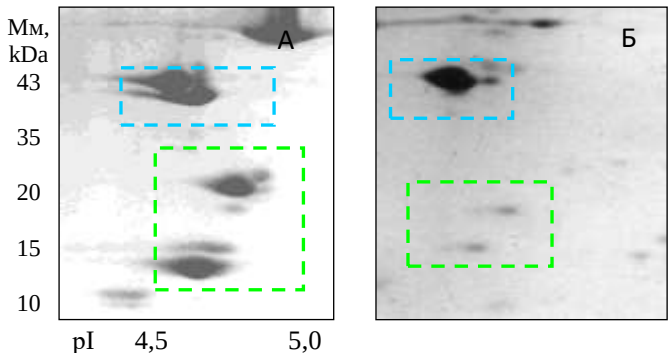


Рисунок 4 – 2ДЭ, *m.l.Dorsi* свинины модификациями в IEF-PAGE (А) и IPG-PAGE (Б) градиентах pH 3-10, окраска Кумасси R-250. Пунктирными прямоугольниками показаны зоны расположения структурных мышечных белков: актинов – красный; тропомиозинов – голубой, МЛЦ – зеленый.

Так же наблюдается, что в центральной и правой частях IEF-PAGE 2ДЭ большее количество фракций (более 70, по сравнению с 35), чем на IPG-PAGE 2ДЭ. К недостаткам ИЭФ (изоэлектрофокусирования) в стандартных условиях на стрипах с иммобилиновым градиентом pH 3-10 можно отнести неполное разделение (и последующее выявление) белков с pI ≥6,2-6,5, в отличие от ИЭФ в амфолиновом градиенте pH.

К преимуществам IPG-PAGE следует отнести высокую чувствительность. Разработанную модификацию целесообразно применять, когда требуется

охарактеризовать тканеспецифические особенности белков, обладающих pI < 6,0. На рисунке 5 представлены результаты анализа электрофоретических свойств тропомиозинов и МЛЦ в образцах различных мышц свинины.



А – скелетная мышца,
Б – гладкая мышечная ткань.
Модификация 2Д,в IPG-PAGE градиен pH 3-10. Окраска нитратом серебра.
Зоны расположения:
тропомиозинов – голубой,
МЛЦ – зеленый.

Рисунок 5 – Фрагменты 2ДЭ, полученные при фракционировании образцов различных мышц свиньи.

Как видно из рисунка 5, во всех образцах определены одинаковые мажорные фракции и с помощью разработанной модификации IPG-PAGE удалось наглядно продемонстрировать тканеспецифические особенности данных групп белков.

В результате разработаны подходы использования протеомных методов для анализа мышечных белков при изучении мясного сырья, выявление и идентификация ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы в мышечной ткани, позволившие заложить научно-практические основы создания системной протеомной стратегии идентификации белкового состава мясной продукции.

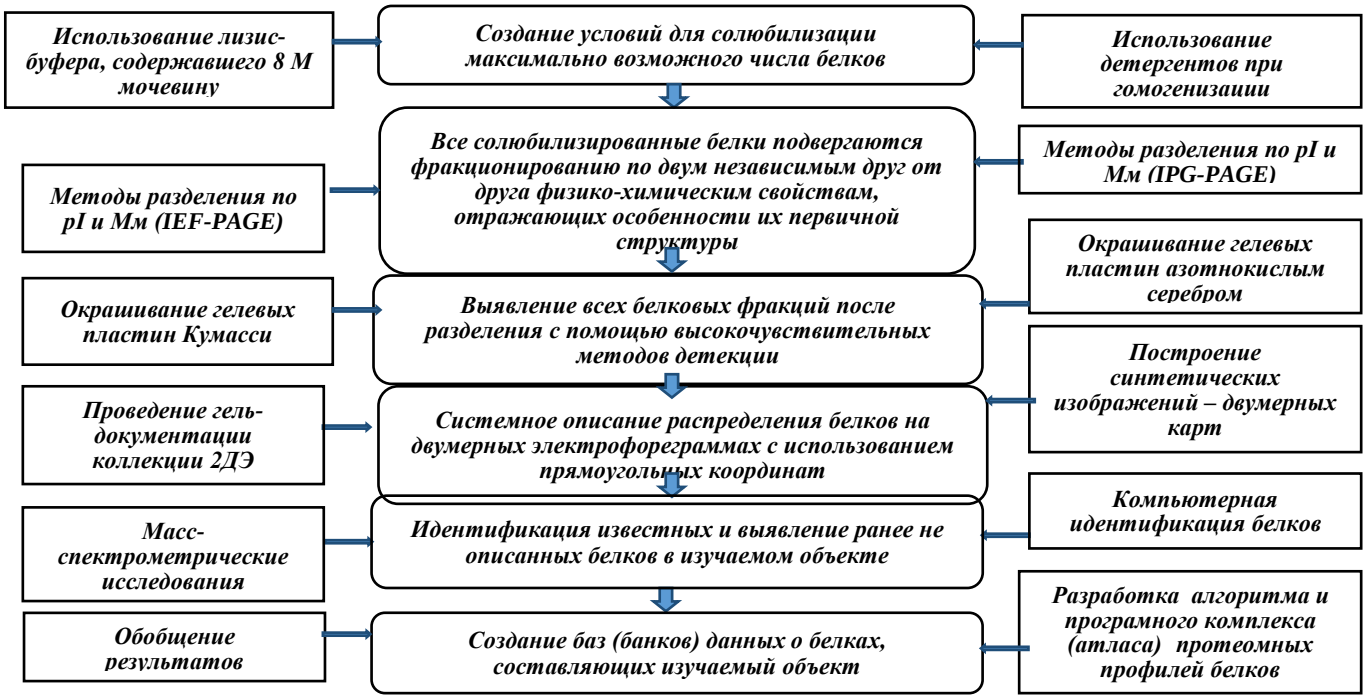


Рисунок 6 – Иерархическая схема практической реализации стратегии исследования мышечного протеома

С учетом формирования теоретической основы решения проблемы были сформулированы научно-практические предпосылки создания системной стратегии анализа протеома тканей и органов животных и птицы – с целью:

✓изучения протеомного состава объектов растительного и животного происхождения,

✓выявления биомаркеров различного состояния животных перед убоем, функционально-технологических свойств мясного сырья и идентификационных признаков аутентичности продукции,

✓анализа белков и пептидов, образующихся в процессе эндогенного или экзогенного воздействия собственными тканевыми ферментами животных,

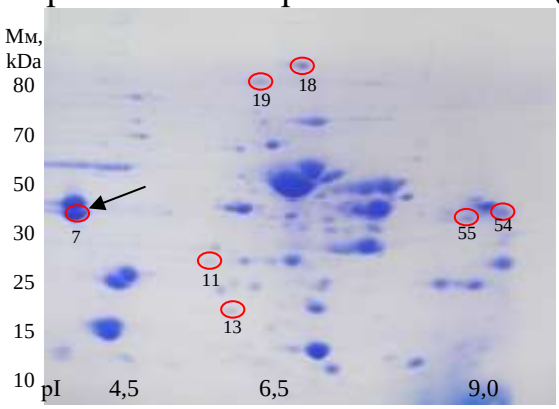
✓изучения механизмов изменения протеома для направленного формирования характеристик качества животного сырья,

✓изучение многообразия белков, полученных в ходе альтеранивного сплайсинга.

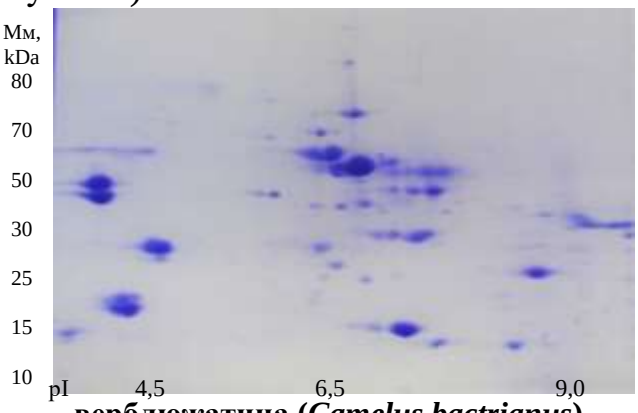
Глава 4. Протеомная идентификация белков

4.1 Идентификация мышечных белков сельскохозяйственных животных и птицы

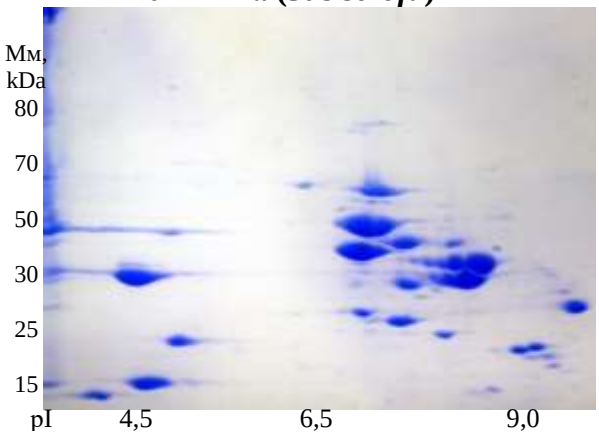
В результате проведенных исследований протеомного (белкового) состава скелетных мышц свинины (*Sus scrofa*), говядины (*Bos taurus*), конины (*Equus caballus*), верблюжатины (*Camelus bactrianus*), курицы (*Gallus gallus*) и индейки (*Meleagris gallopavo*) были получены 2ДЭ белков мышечной ткани убойных сельскохозяйственных животных и птицы, используемые в качестве основного сырья в мясной промышленности (рисунок 7).

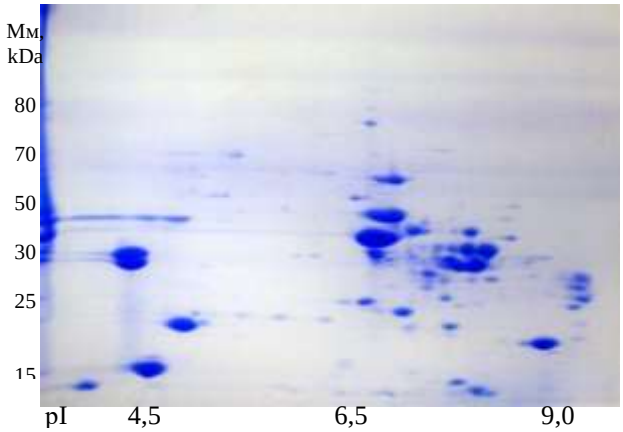


свинина (*Sus scrofa*)



верблюжатина (*Camelus bactrianus*)





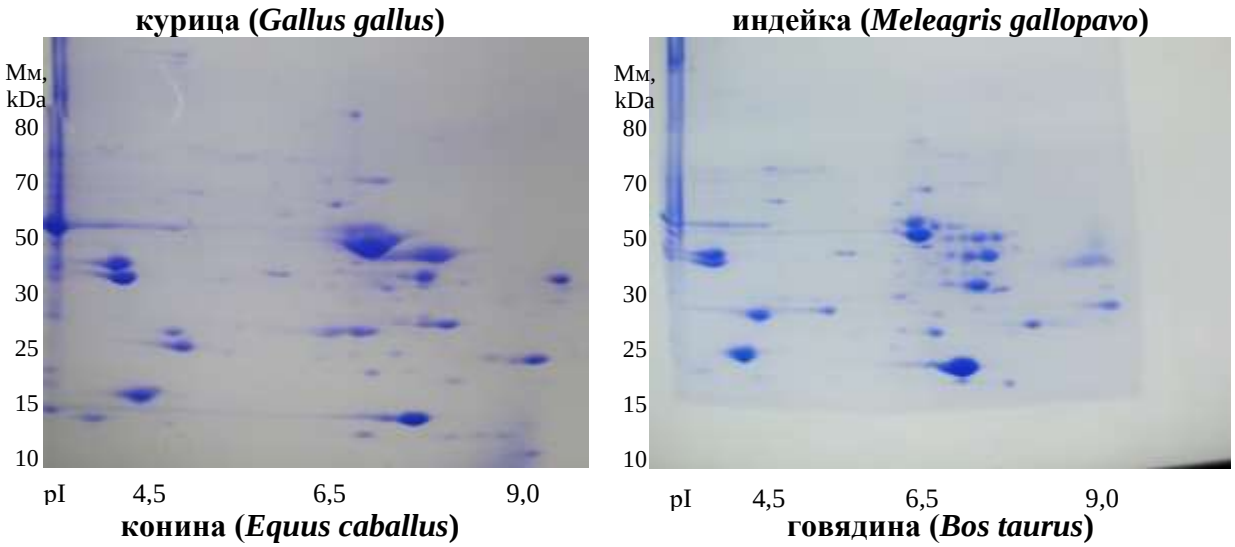


Рисунок 7 – 2ДЭ белков *m.l.Dorsi* убойных с/х животных и грудных мышц птицы.

Всего по полученным 2ДЭ белков *m.l.Dorsi* и мяса птицы было выявлено/идентифицировано методом MALDI-TOF MS: в свинине – 145/108, в верблюжатине –170/114, в говядине – 115/51, в конине – 130/61, курице – 58/32, индейке – 72/37 белка соответственно. Проведенный протеомный анализ обеспечил идентификацию мышечных белков, среди которых основные участники мышечного сокращения (миозины, актин, тропомиозины), ферменты гликолиза и других метаболических процессов (альдолаза, дигидролипоилдегидрогеназа, NADH-дегидрогеназы и другие ферменты митохондрий), белки теплового шока, и несколько тканеспецифичных белков - (десмин, креатинкиназа, миоглобин).

В качестве примера проведенной идентификации в таблице 1 представлены некоторые белки и ферменты гликолиза (рисунок 7, красные овалы) выявленные в мышечной *m.l.Dorsi* свинины. Протеомную идентификацию проводили методами биоинформатики при помощи баз данных (БД), основанных на материалах аминокислотных последовательностей, однако иногда эти последовательности конструировались из данных о транскриптах.

Таблица 1 – Белки, идентифицированные на ДЭ белкового экстракта из *m.l.Dorsi* свинины (*Sus scrofa*).

Номер белка на 2ДЭ	Наименование белка	Номера в Protein NCBI	Мм/pI
7	Тропомиозин изоформа альфа 1	148222268	33,5/4,71
11	Белок теплового шока HSP27	55926209	23,0/5,85
13	Гипотетический белок, содержащий кристаллиновый домен	311257410	19,0/6,05
18	Аконитаза митохондриальная	47522738	86,0/6,80
19	Сыворотный трансферрин	350591529	79,0/6,70
54	С изоформа белка 1, содержащего 4 и 0,5 LIM-домена	47523806	34,0/10,50
55	С изоформа белка 1, содержащего 4 и 0,5 LIM-домена электрофоретический вариант	47523806	33,4/9,60

Вместе с тем, некоторые результаты масс-спектрометрической идентификации подобных белков из-за недостаточности информации требовали дополнительной интерпретации.

Биоинформационная интерпретация основных сократительных белков фракции 7 (отмечена стрелкой на рисунке 7), таких как α-тропомиозин, представлена в виде результатов его масс-спектрометрической идентификации на рисунке 8.

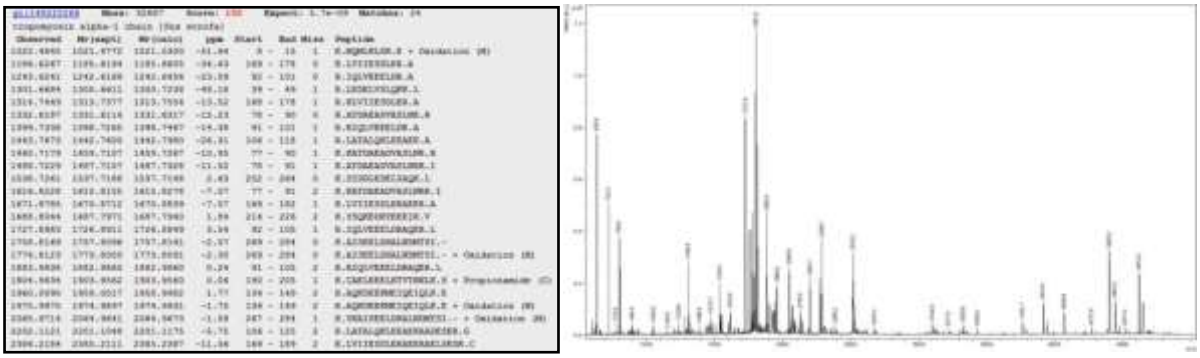


Рисунок 8 – Результаты масс-спектрометрической идентификации фракции № 7 α-тропомиозин *Sus scrofa.*

Для идентифицированного α-тропомиозина, как и для большинства других белков, отмечались близкие к расчетным значения экспериментально определенных молекулярных масс (Мм) и изоэлектрических точек (pI).

Выявленные различия по сравнению с расчетными значениями предположительно связаны с тем, что расчет производился по данным о первичной структуре белка, экстраполированным из сведений о соответствующем транскрипте. При этом игнорировались постсинтетические модификации предполагаемого белка, в частности, удаление сигнальных последовательностей. В случаях, когда прямые данные о таком же белке у другого вида млекопитающих были представлены в БД, проводилась нужная корректировка. Постсинтетические модификации могли оказывать влияние и на результаты определения pI. Так, в ходе проведенной работы было показано, что фракция № 11, идентифицированная как «Белок теплового шока HSP27», является фосфорилированной. Такая модификация очевидно и стала причиной заниженного значения pI (5,83), полученного экспериментально, по сравнению с расчетным (6,23). Вместе с тем, надо отметить, что в некоторых других случаях (например, №18, 19) заниженные экспериментальные значения pI, по-видимому, обусловлены тем, что при использованной методике изоэлектрофокусирования отдельные крупные белки не достигают позиций, соответствующих реальным значениям их pI.

Особый интерес среди идентифицированных белков представляет фракция №13, которая была охарактеризована программой Mascot, как гипотетический белок, содержащий кристаллиновый домен, - продукт гена из локуса *LOC494560*. Результаты, представленные на рисунке 9, свидетельствуют о высокой достоверности данного вывода (% совпадения выявленных масс-триптических пептидов с последовательностью белка - 77%, Score – 371, с учетом результатов

MC/MC). Таким образом, это первое выявление реального существования белкового продукта, соответствующего предсказанному «гипотетическому белку» генома *Sus scrofa*.

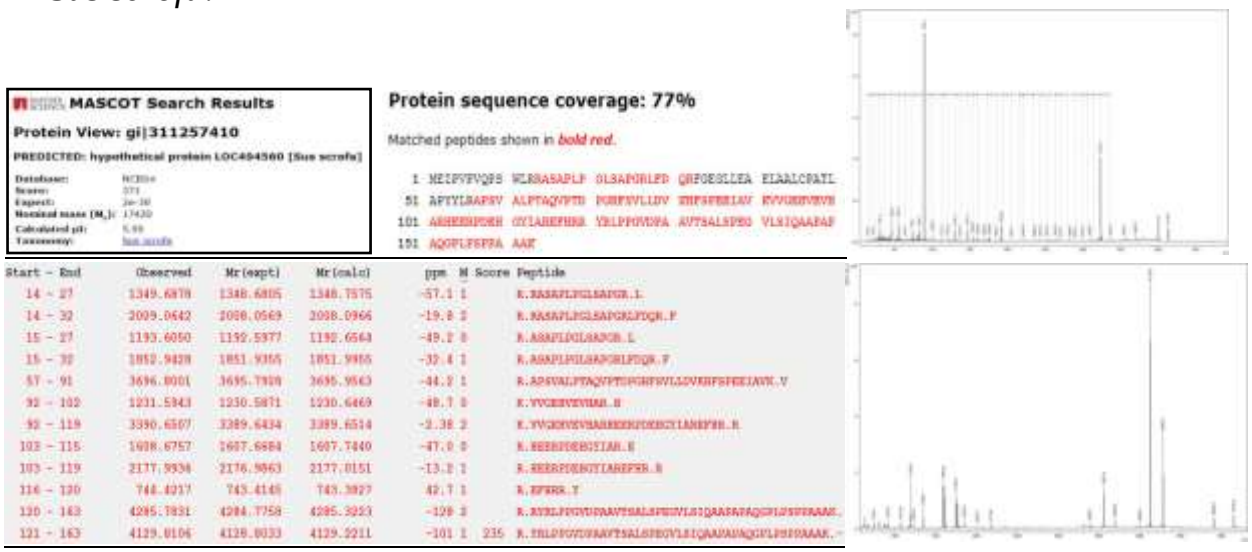


Рисунок 9 – Результаты масс-спектрометрической идентификации фракции № 13.

Результат, полученный при масс-спектрометрической идентификации фракций №54 и 55, показал соответствие этих белков изоформам тропонина Т *Sus scrofa* по показателям Score и Coverage, однако наблюдалось резкое несоответствие одной из электрофоретических характеристик (теоретического и экспериментального значения pI – 5,92 и 9,60). Выявленное несоответствие потребовало проведения дополнительного анализа с использованием тандемной масс-спектрометрии, что привело к заключению о том, что исследованные фракции представляют собой так называемые С изоформы белка 1, содержащего 4 и 0,5 LIM-домена – продукты гена *FHL1C*. На рисунке 10 представлены обобщенные результаты фракции №55.

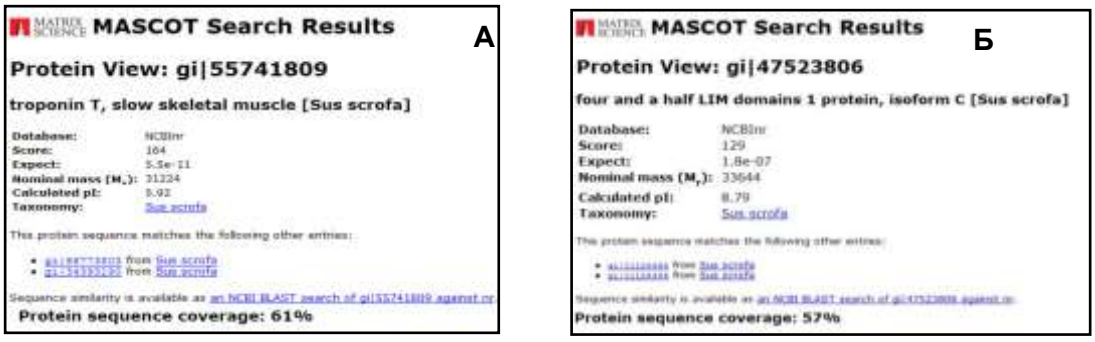


Рисунок 10 – Предварительные (А) и итоговые (Б) результаты масс-спектрометрической идентификации белковой фракции №55.

Результат тандемной масс-спектрометрии (секвенирования) пептида с m/z 1198 приведен на рисунке11, а расположение этого пептида в N-концевой части аминокислотной последовательности С изоформ белка 1, содержащего 4 и 0,5 LIM-домена, показано на рисунке 12 А.

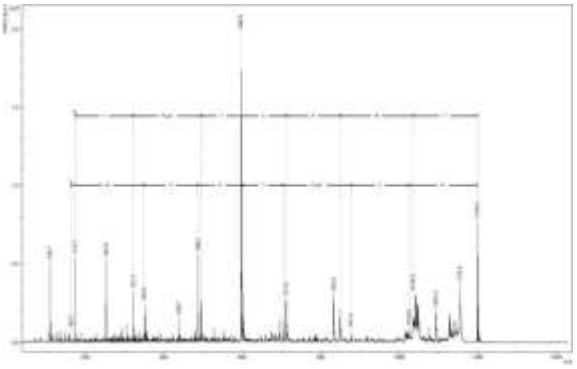


Рисунок 11 – Масс-спектр, триптического пептида с m/z 1198; результаты секвенирования его аминокислотной последовательности в прямом и обратном направлениях, показаны в верхней части рисунка

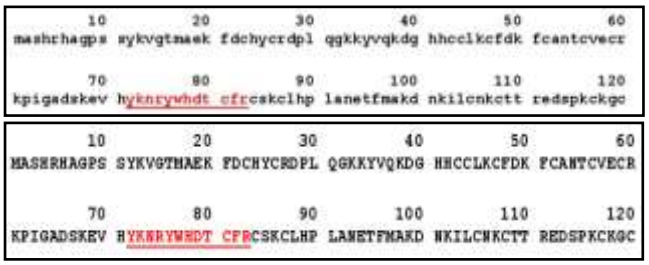


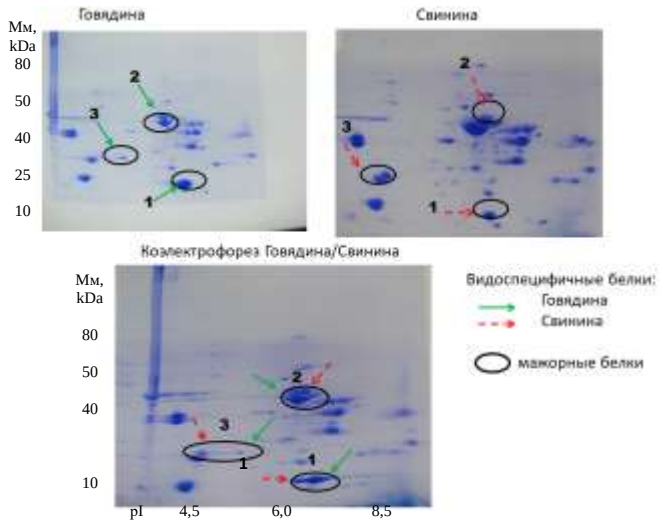
Рисунок 12 – N-концевые участки (1-120 а.о.) аминокислотных последовательностей С изоформ белка 1, содержащего 4 и 0,5 LIM-домена, предсказанные для свиньи по транскриптам и соответствующего, скелетно-мышечного, реально существующего белка человека (В – по Q13642 UniProt). Секвенированный триптический пептид с m/z 1198 выделен красным шрифтом

У предполагаемой (по структуре транскрипта в аннотации 47523806 Protein NCB) аминокислотной последовательности С изоформы белка 1, содержащего 4 и 0,5 LIM-домена, расчетное значение pI оказалось существенно ближе к экспериментальному значению (8,79 и 9,60, соответственно). Однако эти значения практически совпали (9,30 и 9,60) у другого транскрипта свиного белка, зарегистрированного в базе данных UniProt (Q9GL05). Последний, обладая сходным N-концевым участком аминокислотной последовательности, также содержал пептид YKNRFWHDTCFR (рисунок 12 Б), но обладал несколько большим значением Mm – 38 кДа.

Выполненные серии экспериментов впервые позволили собрать воедино большой массив данных о составе мышечных белков с/х (свинина, говядина, конина, верблюжатина) животных и мяса птицы (индейка, курица).

4.2 Изучение ткане- и видоспецифичных различий белков животного происхождения.

Выявление и последующая идентификация белков в сырье и мясной продукции в большинстве случает становится проблематичной из-за наложения белков друг на друга с одинаковой массой на электрофореграмме, что делает невозможным достоверную расшифровку протеома. Решением стало применение коэлектрофореза, при котором одновременно электрофоретическому разделению подвергаются два сравниваемых образца, внесенные в общую пробу. На примере модельных фаршей показана возможность применения коэлектрофореза для разделения белков животных с одинаковой молекулярной массой, но с видоспецифичными различиями (рисунок 13).



Наименование белка	Свинина Мм / pI	Говядина Мм / pI
1.миоглобин	16,956/6,83	16,946/6,97
2.β-Енолаза	46,0/6,8	47,1/6,7
3.МЛЦ	21,0/4,73	20,8/5,0

Рисунок 13 – Результаты сравнительного протеомного анализа образцов *m.l.Dorsi* говядины и свинины при коэлектрофорезе.

Так, при одинаковой молекулярной массе, например, миоглобина, равной 16,9 кДа, величины изоэлектрических точек достоверно различаются. У свиного – 6,83, у говяжьего – 6,97, что наглядно видно на двумерной электрофореграмме. Аналогичные различия отмечены и для других белков. В итоге удалось продемонстрировать наличие видоспецифичных различий в электрофоретических свойствах у миоглобиновых белков, а также у изоформ β -енолазы и изоформ МЛЦ и возможность их одновременного выявления и идентификации из одного образца.

Миоглобины конины/говядины/верблюжатины/индейки представляют дискретные пятна, различающиеся по pI, что позволяет визуально определить их наличие на полученных электрофореграммах, однако миоглобины конины и говядины для идентификации между собой малопригодны, вследствие высокой гомологии и совпадения по электрофоретическим характеристикам.

С целью практического применения предложенной протеомной стратегии изучали мясные фарши, которые включали в своем составе следующие варианты сырья: конина/говядина, конина/говядина/верблюжатина и конина/говядина/ верблюжатина/индейка. Результаты сравнительного протеомного анализа (рисунок 14 А, таблица 2) показали, что в роли биомаркеров видовой идентификации могут выступать белки нескольких семейств. Фракции α и β–гемоглобина видоспецифичны (рисунок 14 В №13-16), хорошо дифференцируются.

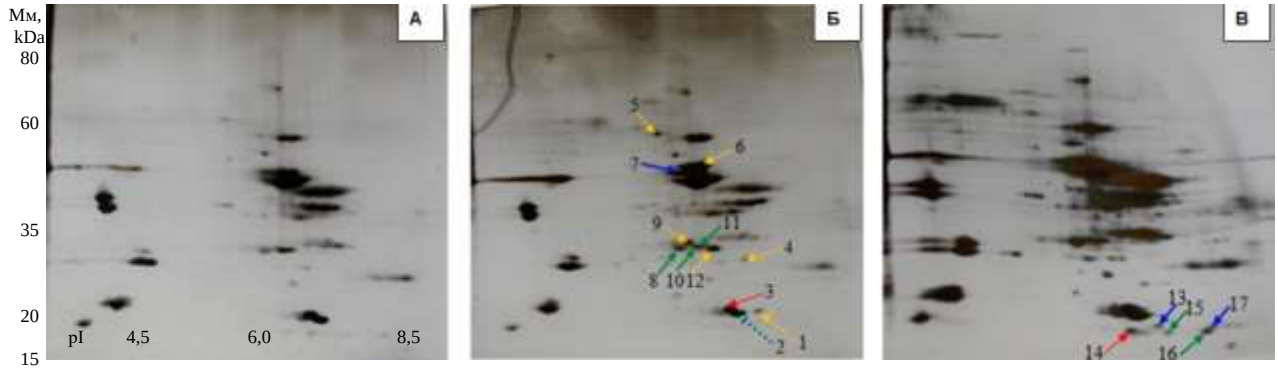


Рисунок 14 – Протеомные профили мясных систем: А – говядина/конина,
Б – говядина/конина/верблюжатина/индейка, В - говядина/конина/верблюжатина

Нумерация приведена в соответствии с таблицей 2. Желтые стрелки обозначают белки индейки, красные - говядины, синие – верблюжатины и зеленые – конины. Стрелка 2 к белку обозначает смесь белков двух видов животных.

Таблица 2 – Результаты масс-спектрометрической идентификации биомаркеров видоспецифичности мясного сырья

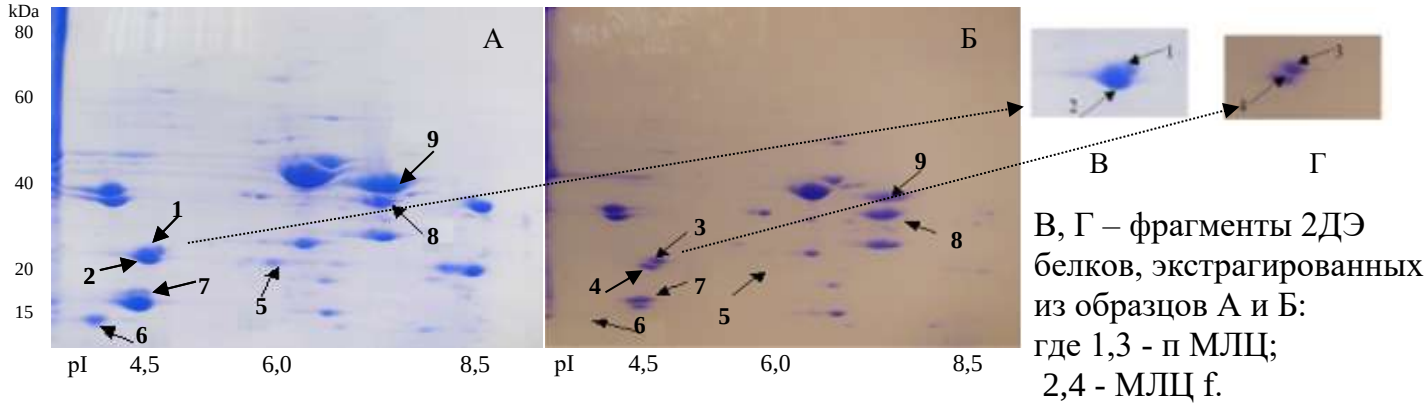
№	Белок	Мм	pI
1	Миоглобин *Meleagris gallopavo*	17,3	7,40
2	Смесь миоглобин *Equus caballus* и Миоглобин *Camelus ferus*	17,3	7,30
3	Миоглобин *Bos taurus*	17,8	7,10
4	Аденилаткиназа изоформа X2 *Meleagris gallopavo*	21,0	7,35
5	Фосфоглюкомутаза -1 *Meleagris gallopavo*	65,0	6,15
6	Гомолог β-енолазы *Gallus gallus*	47,0	7,15
7	β-енолаза *Camelus dromedarius*	46,0	6,90
8	Триозофосфат изомераза *Equus caballus*	30,0	6,70
9	Гомолог фосфоглицератмутазы 1*Gallus gallus*	31,0	6,90
10	Триозофосфат изомераза *Equus caballus* изоформа	30,0	6,95
11	Триозофосфат изомераза *Equus caballus*	31,0	6,98
12	Триозофосфат изомераза *Meleagris gallopavo*	30,0	7,00
13	β-гемоглобин *Camelus bactrianus*	16,0	7,40
14	β-гемоглобин *Bos taurus*	15,5	7,20
15	α-гемоглобин *Equus caballus*	15,3	7,50
16	Миоглобин *Equus caballus*	15,3	7,70
17	α-гемоглобин *Camelus bactrianus*	15,4	7,80

Результаты сравнительного протеомного анализа показали, что в роли биомаркеров могут выступать белки: миоглобины, β-енолаза, триозофосфат изомераза 1, α- и β-гемоглобины, аденилаткиназа, фосфоглицератмутаза и фосфоглюкомутаза. Для идентификации видоспецифичности мяса птицы

наиболее подходит как маркер комплекс белков, включающий аденилаткиназу, фосфоглицератмутазу, β-енолазу и фосфоглюкомутазу.

Известно, что на формирование пороков PSE и DFD в значительной мере оказывает влияние соотношение в мышечной ткани волокон гликолитического (белые), окислительного (красные), а также промежуточного типа, основное различие которых состоит в разном содержании в них гликогена и миоглобина. Эти различия, в свою очередь, определяют скорость течения биохимических процессов, как при жизни, так и post mortem. Например, известно, что при малоподвижном образе жизни формируется преимущественно гликолитические волокна, однако при возобновлении двигательной активности растет число окислительных волокон, хотя, и не так быстро как процесс перехода окислительных волокон в гликолитические. Поэтому представлялось интересным применить стратегию исследования мышечного протеома при изучении протеомного профиля свинины в зависимости от типа мышечного волокна, для чего отбирали образцы с различным соотношением красных/белых/промежуточных мышечных волокон, подтвержденным микроструктурным препарированием. Свинина с преобладанием белых волокон содержала соотношение:18±1/77±1/5±1 (рисунок 15 А) и при преобладании красных волокон содержала соотношение: 26±1/63±2/11±1 (рисунок 15 Б). В результате получены различающиеся протеомные профили, связанные с видимыми количественными различиями содержания ряда белков.

В частности, обнаружены по две изоформы МЛЦ со сходными электрофоретическими свойствами, но с разной молекулярной массой (Mw/pI): белок подобный МЛЦ (п МЛЦ)-21,8/5,00 и фосфорилированный белок МЛЦ (МЛЦ f) -21,0/4,90, в исследуемых образцах.



В, Г – фрагменты 2ДЭ белков, экстрагированных из образцов А и Б:
где 1,3 - п МЛЦ;
2,4 - МЛЦ f.

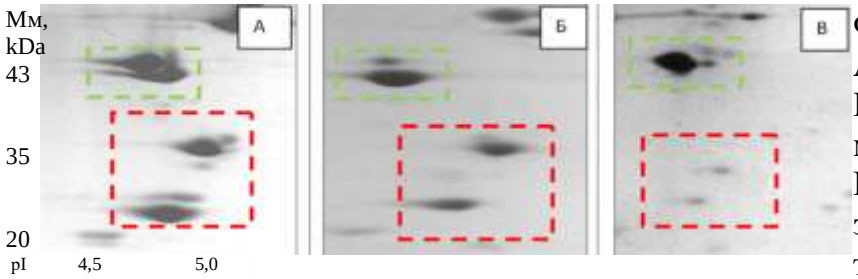
Рисунок 15 – Электрофореграммы свинины с белыми волокнами (А) и красными волокнами (Б).

При этом выявлено, что один из белков является быстрой изоформой МЛЦ (фрагмент Г), а другой – медленной (фрагмент В). На электрофореграммах (А,Б) видны количественные различия (по интенсивности окраски пятна) в содержании таких белков как: изоформа п МЛЦ (фракция №1, имеющая намного меньшую окраску в белых волокнах, чем в красных фракция №3), изоформа МЛЦ f (фракция №2, имеющая намного большую окраску в белых волокнах, чем в красных фракция №4), не идентифицированных белков (фракция №5,6,

аналогично отсутствующих в красной свинине), и других белков (также в соотношении альдолазы А (№9) и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГЗФД) (№8).

В результате можно ожидать различий в характере метаболизма этих волокон, что в свою очередь, оказывает влияние на функционально-технологические свойства сырья, в основном на скорость течения автолитических изменений.

Стимулирование разработок в XXI веке функциональных мясных продуктов способствовало повышенное внимание к различным органам животных (обладающих большим числом биоактивных пептидов), как к потенциальному сырью для специализированных мясных продуктов. В связи, с чем была так же необходима адаптация используемых методологий и относительно не только вида, но типа ткани, которая была успешно проведена и подтверждена выявлением аналогичных маркерных белков и в различных типах тканей животных (рисунок 16).



Фрагменты 2ДЭ:
А – скелетная мускулатура,
Б – поперечнополосатая мускулатура,
В – гладкая мускулатура
зоны:
тропомиозинов(зеленый),
МЛЦ(красный).

Рисунок 16 – Электрофореграммы свинины различного типа ткани.

Таким образом, подводя итог первой части работы можно сделать вывод о высоком потенциале протеомных стратегий как инструмента изучения особенностей и механизма биотрансформации белков животных тканей. В результате исследований определены предпосылки создания методик идентификации белков животного и растительного происхождения по специальным маркерам.

Далее исследования были сконцентрированы на изучении взаимосвязей белковой системы мяса при изменяющихся условиях биохимических процессов в мышцах. На следующем этапе исследований был изучен характер изменения мышечных белков свинины при созревании мяса с учетом принадлежности к различным группам качества: нормальное (NOR), бледное, мягкое, водянистое (PSE) и тёмное, жёсткое, сухое (DFD). Важно было обнаружить различия в их белковых профилях и найти белки, которые могут являться маркерами такого вида сырья. Данный аспект представлял интерес и с практической точки зрения, когда возникают трудности при отнесении мяса по градации качества, например, ВУС не коррелирует с pH, и мясо, попадая в технологический цех, идет на переработку, приводящую к выпуску продукции ненадлежащего качества (отеки в

вакуумной упаковке). В настоящее время в отрасли достаточно остро стоит данный вопрос.

Протеомная идентификация автолитических изменений белков свинины показала следующее (рисунок 17). Наиболее ярким признаком автолиза является появление фрагментов тропонина Т быстрых скелетных мышц (на рисунке выделено пунктирными прямоугольниками). При наличии обычной фракции тропонина Т детектировалось появление и увеличение трех дополнительных фрагментов, различающихся по молекулярной массе и pI. Отмечено нарастание количества фрагментов таких белков как, пируваткиназа (1), α-енолаза(2), мышечная креатинфосфокиназа (3) и Г3ФД (4), аденилаткиназа, α В –кристаллин (фракции выделенные овалами). Так, была выявлена корреляция распада мышечных белков (тропониновой группы/семейства тропонинов) и характеристик мяса, в т.ч. в образцах с нормальным течением автолиза достаточно выражено происходил распад тропонина I, в области тропонина Т быстрых скелетных мышц детектировалось появление и увеличение трех дополнительных фрагментов к 5-м суткам.

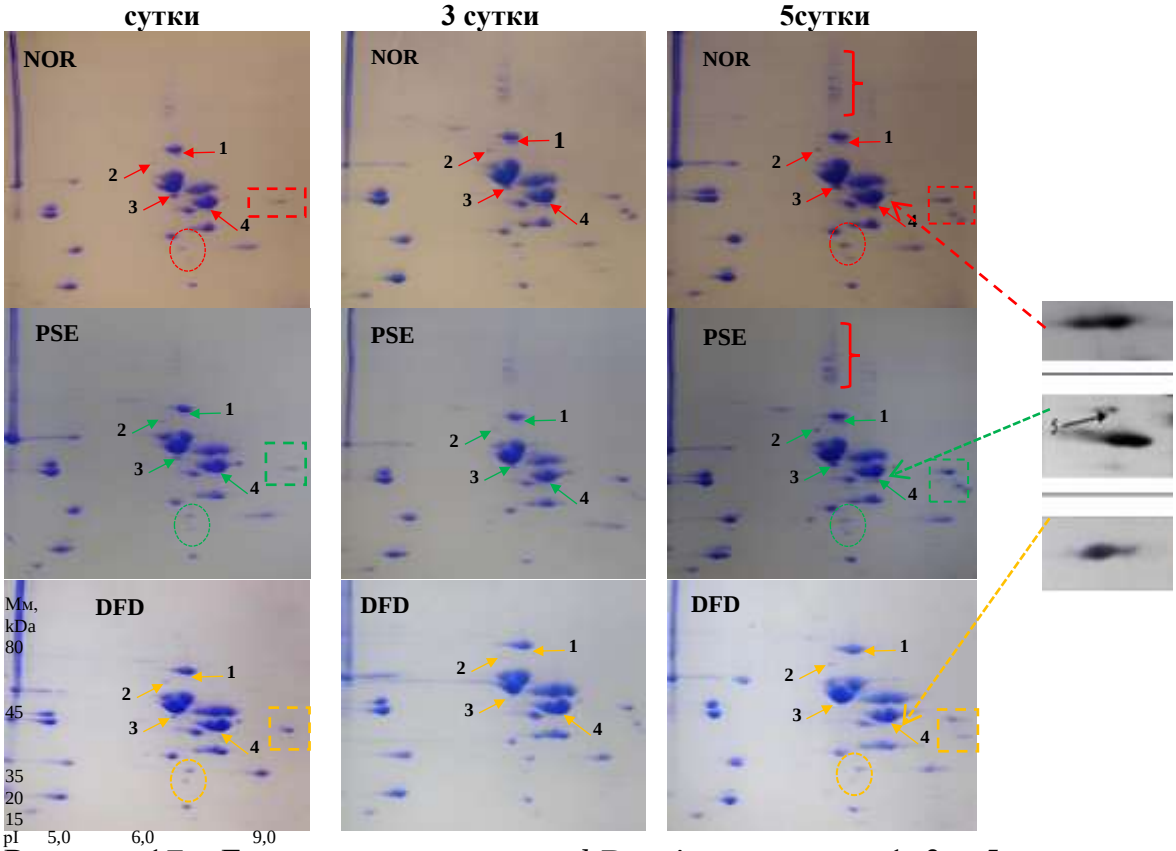


Рисунок 17 – Белковые паттерны *m.l.Dorsi* свинины на 1, 3 и 5 сутки автолиза.

Специфическими признаками PSE мясного сырья являлось проявление на 5-е сутки автолиза короткого N-концевого фрагмента (21 кДа) Г3ФД (5), что говорит о некоей специфичности автолиза (активации других типов мышечных протеаз) в этой ткани. При этом в образцах мяса DFD наиболее существенно распадался на более короткие пептиды самый низкомолекулярный компонент МЛЦ 2, что являлось специфичным для этого типа мяса. Кроме этого, при наличии обычных

изоформ белков отмечалось нарастание количества фрагментов пируваткиназы, α-енолазы, мышечной креатинфосфокиназы, Г3ФД, тропонина I, аденилаткиназы, α-кристаллина В, МЛЦ и кофилина-2. Выявлено, что процесс распада тропонина более выражен в ткани с нормальным ходом автолиза, но менее выражен в образцах с аномальным автолизом. В целом, показано, что процессы деградации белков в DFD мясе были менее выраженными, чем в PSE и NOR. Очевидно, что в процессе автолиза происходит разрушение белков и формирование полипептидов, в частности, распад специфических миофибриллярных белков и белков цитоскелета, титина и небулина (зона образования отмечена фигурной скобкой рисунок 17). Поскольку титин и небулин в сумме составляют почти 15% от общего количества белков мышечного волокна, то управление процессами разрушения этих белков может оказывать достоверное влияние на процессы формирования нежности и ВСС мяса, особенно, учитывая различную скорость распада титина и небулина post morthem. Анализ пептидного состава трех типов мышечной ткани с разным типом автолиза на 1, 3 и 5 сутки показал (рисунок 18), что автолитические процессы со временем приводят к увеличению количества пептидов, однако в свинине PSE выявлено наименьшее количество пептидов, в свинине DFD отмечено наибольшее количество низкомолекулярных соединений, что предположительно объясняется высокой активностью протеолитических ферментов в мясе, которые и поддерживают динамическое равновесие.

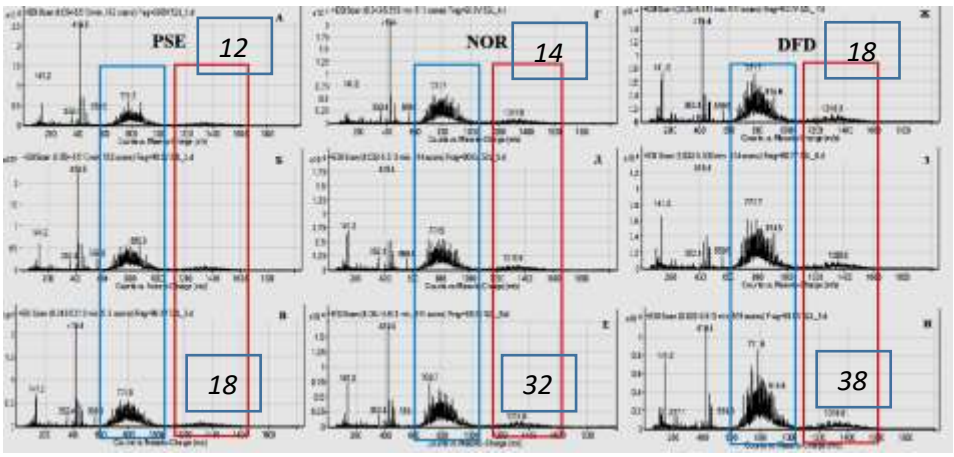


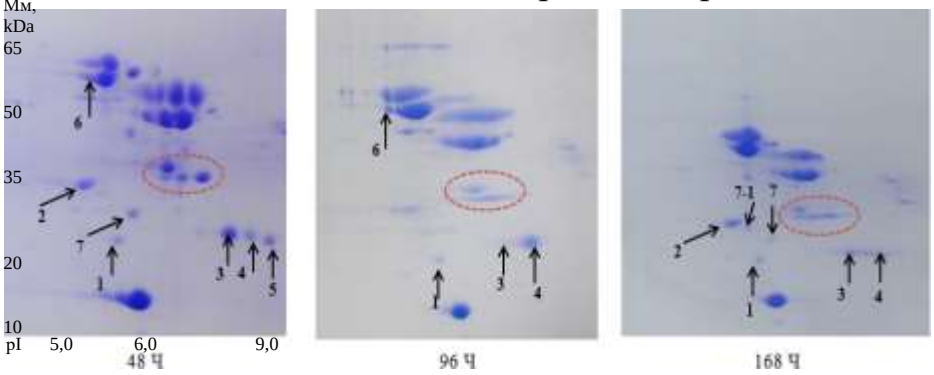
Рисунок 18 – Результаты исследования пептидного профиля *m.l.Dorsi* свинины с разным характером автолитических изменений на 1, 3 и 5 сутки автолиза. А, Б, В – мясо PSE, Г, Д, Е – мясо NOR, Ж, З, И – мясо DFD, А, Г, Ж – 1 сутки автолиза, Б, Д, З – 3 сутки автолиза, В, Е, И – 5 сутки автолиза.

При этом методологией 2Д данное заключение не подтверждается, по-видимому, из-за более низкой чувствительности метода, по сравнению с технологией MS/MS анализа. Основные различия между типами мяса наблюдались в областях 600–1000 Да и свыше 1000 Да.

В свинине PSE выявлено 12 характерных пептидов, к 5-м суткам автолиза их количество увеличивалось – до 18; в свинине NOR – 14 и к 5-м суткам автолиза их количество увеличивалось – до 32; в свинине DFD – 18, 38 и 38 характерных пептидов на первые, третьи и пятые сутки, соответственно или в 1,5-2,1 раза

больше, чем в других образцах на всем протяжении эксперимента. В результате полученных данных можно предложить следующее: в течение первых 3-х суток в свинине происходили, в основном, автолитические разрушения белков, а затем очевидно вступают в действие экзогенные протеиназы микробиального происхождения, что наиболее выражено в мясе DFD, как наиболее чувствительного к атаке микроорганизмами в связи с более высоким pH. Стоит отметить, что установленные взаимосвязи могут быть обусловлены промышленным способом выращивания свиней, характеризующимся интенсивным ростом мышечной массы, что, в свою очередь может вызывать изменение метаболизма мышц в сторону увеличения доли волокон гликолитического и промежуточного типов.

Изучение динамики изменения белкового профиля и влияние кислорода на эти изменения представлено на рисунке 19. Исследования проводили на образцах *m.l.Dorsi* говядины. Дизайн эксперимента представлен в главе 2.



1- фрагмент пируваткиназы,
2- флавин (редуктазный домен-содержащий белок),
3- Г3ФД,
4- альдолаза А,
5- фосфорглицерат мутаза 2,
6- β-енолаза,
7- МЛЦ и 7–1- агрегат белка МЛЦ.

Рисунок 19– Центральный фрагмент 2ДЭ специфических белков *m.l.Dorsi* говядины при хранении в вакуумной упаковке через 48 ч, 96 ч и 168 ч автолиза.

При увеличении срока хранения с 48 час до 168 час исчезают минорные белковые фракции. Часть белкового материала таких фракций утилизируются в пептиды и они перестают детектироваться. Для ряда мажорных белков, таких как Г3ФД, альдолаза А, мышечная креатинфосфокиназа (КФК) и β-енолаза, флавин (редуктазный домен-содержащий белок) и фрагмент пируваткиназы отмечалась определенная размытость контуров электрофоретических фракций (выделено пунктиром), очевидно, как результат автолитических воздействий и переработки только концевых фрагментов у части белковых молекул, идет через образование чуть более коротких фрагментов. Исчезла верхняя электрофоретическая фракция МЛЦ скелетной мышцы, но появился и начал увеличиваться в количестве его фрагмент, и на 4-е сутки появился характерный трек агрегата белка, содержащего четыре с половиной LIM домена (фракция 7-1). Аминокислотная последовательность данного белка не превышает по массе 32 кДа. Это означает, что при автолитических изменениях мышечной ткани этот белок, образует разные агрегаты МЛЦ, формирующий характерный электрофоретический трек, что является весьма необычным свойством. Кроме этого, были идентифицированы и фрагменты появившихся минорных компонентов. В частности, появилась укороченная фракция тяжелой цепи миозина 2, увеличилось количество

экстрагируемого белка теплового шока 71 кДа и фракций пируваткиназы. Некоторая часть β-енолазы начала детектироваться с изменениями в pI. Вновь появились агрегаты фрагментов, но уже смешанного типа: КФК и глутатион-S-трансферазы, актина и перилипина, кератина II типа, пируваткиназы и β-енолазы. И, кроме этого, также образовались просто фрагменты таких белков, как аденилаткиназа, пируваткиназа, ГЗФД и альдолаза А. В образцах мышечной ткани говядины, при анаэробных условиях сохранялось стандартное распределение основных фракций сократительного и ферментного аппарата. При увеличении срока хранения с 2 до 7 сут выявлено отсутствие минорных белковых фракций под действием эндогенных ферментов. При вскрытии упаковки и дальнейшем хранении, отмечалось появление признаков окисления белков, например, пируваткиназы и β-енолазы с изменением pI в кислую сторону в большем количестве по сравнению с анаэробными условиями. При вскрытии упаковки значительно ускоряются процессы окисления белков, что напрямую связано и с ухудшением органолептических характеристик мяса, и с изменением срока годности. Понимание механизмов изменений белков окажет значительную помощь в улучшении технологии мяса путем моделирования и прогнозирования автолитических изменений, оказывающих непосредственное влияние на ФТС мяса: ВУС, pH, нежность и сочность. Данные аспекты так же могут найти и практическое применение в случае обработки мясного сырья протеазами при тендеризации, путем синергетического моделирующего воздействия эндогенных и экзогенных ферментов.

Таким образом, был определен перечень биомаркеров автолитических изменений, представленный 2-мя группами: на ранних стадиях – МЛЦ, β-Енолаза, фосфорглицерат мутаза, флавин; на поздних стадиях – трек агрегата белка 1, содержащего четыре с половиной LIM домена, белки теплового шока (HSPA8, HSPB6), пируваткиназа, титин.

Результаты, которые были получены на данном этапе работ, можно охарактеризовать как новый и важный шаг в изучении автолитических и протеолитических процессов в мясном сырье и готовой продукции, что будет способствовать модернизации отечественных разработок, направленных на улучшение и управление механизмами, формирующими качество мясной продукции и прогнозирования образования целевых пептидов, в том числе и со специфическими свойствами.

5. Практическое применение протеомики для определения состава мясных продуктов

Дальнейшие исследования были сконцентрированы на практическом применении полученных знаний для установления специфических белковых маркеров для оценки аутентичности термообработанной мясной продукции (на примере вареных колбасных изделий) и содержания видоспецифичных мышечных тканей и ингредиентов немышечного происхождения. Для этого были выработаны образцы вареной колбасы «Докторская» в строгом соответствии ГОСТ Р 52196-2011и ГОСТ 33673-2015 и ТИ, и получен Протеомный паспорт

данной продукции, который в дальнейшем служил эталоном. Строгое соответствие состава подтверждено аттестованными методами – ПЦР и гистологическим (рисунок 20 А, Б).

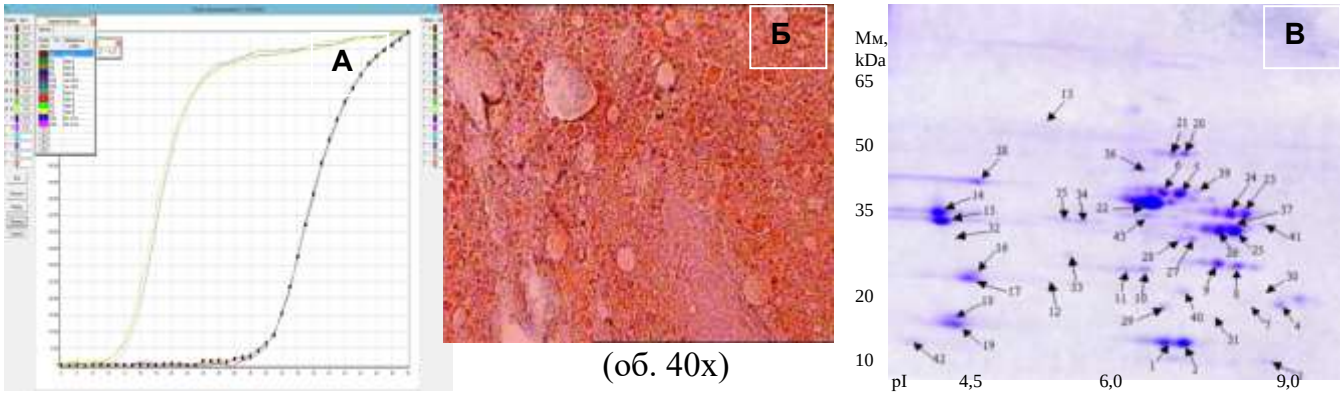


Рисунок 20 – Сравнительное изучение колбасы «Докторская» различными методологиями: А – ПЦР исследования, Б – гистологическая идентификация, В – протеомная идентификация белков эталонный образец.

Практическое применение протеомных стратегий при анализе мясной продукции позволяет получить достоверные ответы на три важных вопроса, которые интересуют контролирующие организации и потребителей относительно качества колбасных изделий, а именно: 1) соответствие технологии ГОСТам или ТУ; 2) соблюдение рецептуры, то есть, присутствие немясных белков, либо белков немышечного происхождения, или мышечных белков, но не относящихся к основному сырью согласно рецептуре и 3) количественное соотношение сырья в готовом продукте.

Типичная 2ДЭ эталонной колбасы представлена на рисунке 20 В. Всего выявлено и идентифицировано 43 основных белка. Эффективность разработанной стратегии, основанной на типичных маркерных мышечных белках, подтверждена в эксперименте, когда в состав, помимо свинины и говядины, была включена птица (индейка/курица в соотношении 1:1).

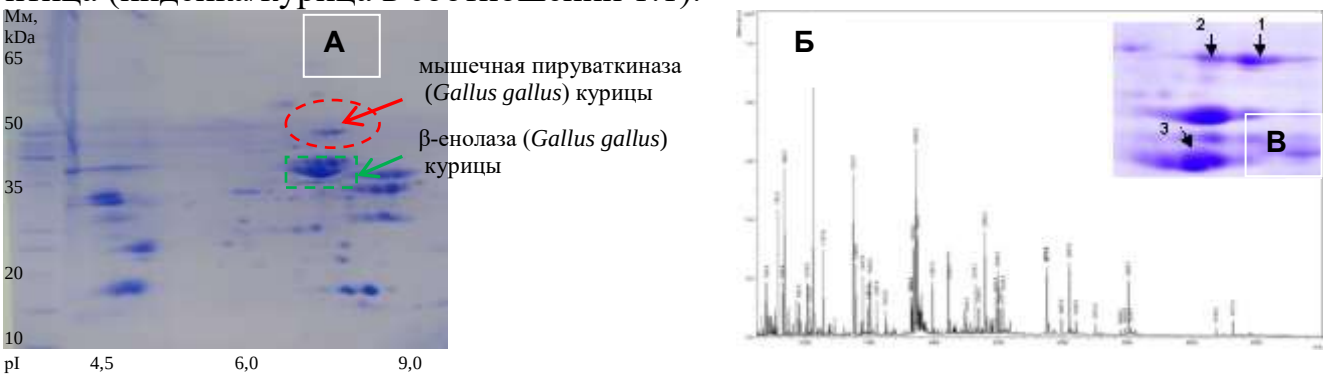


Рисунок 21 – Результаты протеомной идентификации куриной пируваткиназы в образце колбасы Докторская (А).

Б – Масс-спектр триптических пептидов, полученный при MALDI-TOF MS идентификации фракции отмеченной зеленой стрелкой рис.21А как пируваткиназа *Gallus gallus*.

В – Фрагмент 2ДЭ с идентифицируемой фракцией №1 и двумя реперными фракциями №2 (пируваткиназа *Sus scrofa*) и №3 (креатинкиназа *Sus scrofa*).

Протеомная идентификация выявила наличие дополнительных белков β-енолазы (зеленая стрелка) и мышечной пируваткиназы (обозначена красной стрелкой). Аналогичный гликолитический фермент представлен и в эталонном образце фракция № 20, но принадлежащий *Sus Scrofa*. В результате эксперимента установлено, что при соблюдении требований ГОСТ по химическому составу колбасы, ее ингредиентный состав сфальсифицирован. Метод был апробирован на 5 образцах колбасы вареной Докторской разных производителей, закупленных в торговой сети города Москвы. В результате была выявлены дополнительные фракции (рисунок 22 центральные фрагменты 2ДЭ).

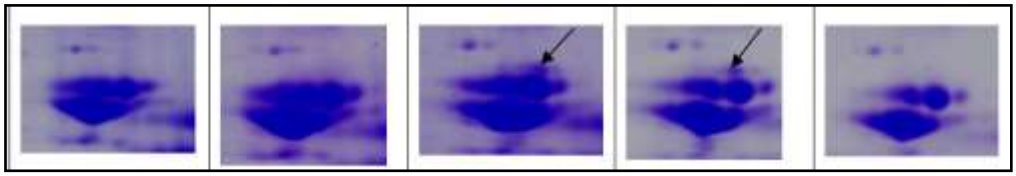
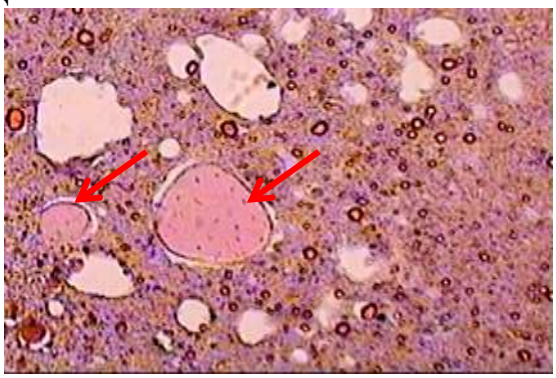
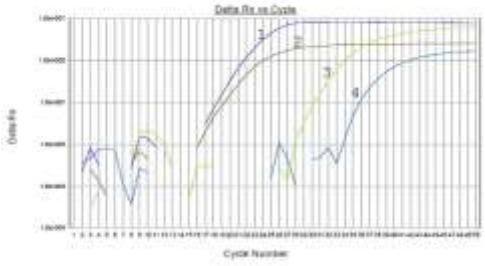


Рисунок 22 – Центральные фрагменты 2ДЭ белков образцов колбасы Докторской (разных производителей).

Стрелками обозначены: α-субъединица митохондриальной синтазы индейки (*Meleagris gallopavo*) [ген *ATP5A1*]. Проведенный масс-спектрометрический анализ этих дополнительных фракций позволил достоверно идентифицировать их как альфа субъединицу митохондриальной АТФ синтазы индейки (ген *ATP5A1*). Присутствие в образцах мяса птицы было подтверждено как гистологией, так и ПЦР.





1- ДНК свиньи, 2- ДНК КРС,
3- ДНК курицы, 4- ДНК сои

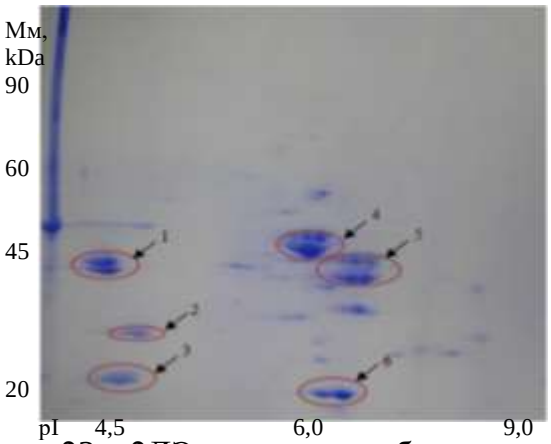
Рисунок 23 – Микроструктура вареной колбасы гистологией (фрагменты мяса птицы в структуре фарша отмечены стрелкой) и идентификация мяса птицы методом ПЦР.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о надежности протеомной идентификации гомогенных мясных продуктов, несмотря на термическую обработку, вызывающую денатурацию белков. Представляется целесообразным создание пакета (атласа) протеомных карт мясных продуктов для качественного подтверждения соответствия состава мясного продукта заявленному составу.

Поэтому на следующем этапе с помощью протеомных технологий были отобраны фракции белков, приемлемые для оценки содержания мышечных

белков в мясных продуктах и заявленные в дальнейшем в качестве биомаркеров аутентичности вареных колбасных изделий.

Количественное содержание белков мяса оценивалось по пятнам 6 групп белков, идентифицированных как мажорные мышечные. Эти группы белковых фракций показаны красными овалами на рисунке 24, параметры идентификации приведены в таблице 3.



1 – фракции α- тропомиозинов,
2 – структурные МЛЦ,
3 – фосфорилируемые МЛЦ,
4– изоформы β-Енолазы и КФК,
5 – альдолазы А и ГЗФД
6 – миоглобины.

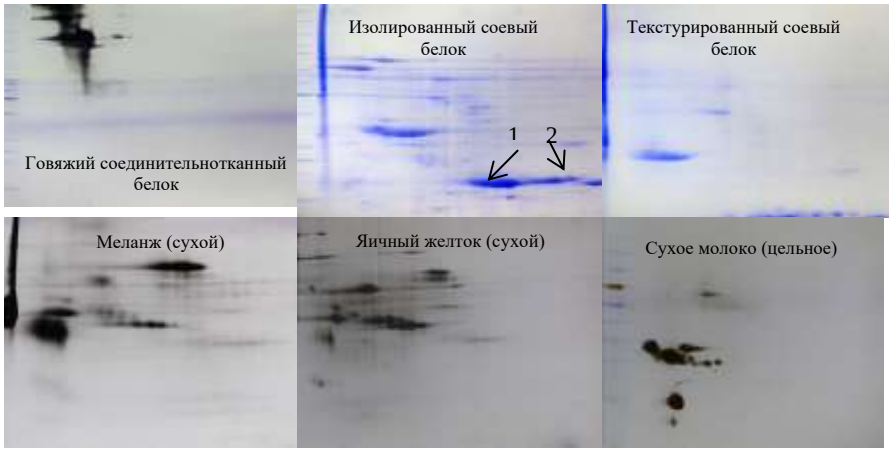
Рисунок 23 – 2ДЭ эталонного образца колбасы вареной Докторская.

Таблица 3 Параметры идентификации белков

№	Название белка	Mw	pI
1	Тропомиозин альфа 1 (*Bos taurus*)	32,7	4,69
	Тропомиозин альфа 1 (*Sus scrofa*)	32,7	4,71
2	Белок п МЛЦ 3 (*Bos taurus*)	22,0	5,00
	Белок п МЛЦ 3 (*Sus scrofa*)	21,8	5,00
3	МЛЦ 1f (*Sus scrofa*)	20,9	4,90
	МЛЦ 1f (*Bos taurus*)	19,5	4,73
4	β-Енолаза(*Sus scrofa*)	47,1	8,05
	β-Енолаза (*Bos taurus*)	47,1	7,60
	М-цепь Креатинфосфокиназы (*Bos taurus*)	43,0	6,63
	М-цепь Креатинфосфокиназы(*Sus scrofa*)	43,0	6,61
5	Фруктозобисфосфат-альдолаза А (*Bos taurus*)	39,4	8,45
	Фруктозобисфосфат-альдолаза А (*Sus scrofa*) гомолог (*Bos taurus*)	40,0	8,7
	ГЗФД (*Sus scrofa*)	35,8	8,51
	ГЗФД (*Bos taurus*)	35,8	8,50
6	Миоглобин (*Sus scrofa*)	17,1	6,76
	Миоглобин *(Bos taurus*)	17,7	6,90

Таким образом, показано, что разработанный метод позволяет с высокой степенью точности выявить типичные для колбасных изделий видоспецифичные белки животного происхождения. По результатам работ был получен патент «Способ подтверждения аутентичности вареных колбасных изделий». Заявляемое техническое решение относится к области контроля качества вареных колбасных изделий по их протеомному профилю.

Протеомный анализ белков, входящих в состав ингредиентов, используемых в мясном производстве показал, что каждый вид образцов характеризуется вполне определенным белковым профилем (рисунок 24).



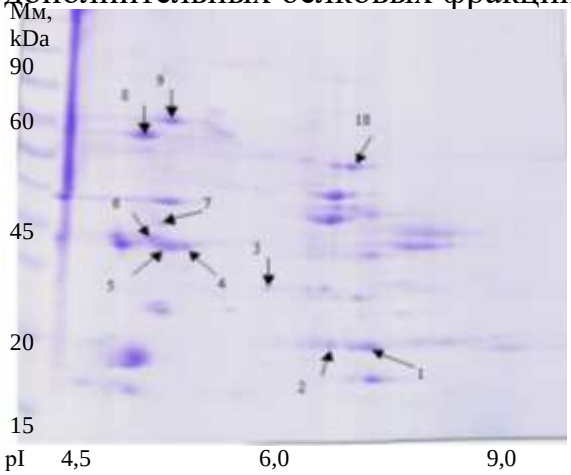
№	Белок	Mw/pI эксперим
1	Глицинин A3B4 (glicine soja), фрагмент 350-513	21,0/7,80
2	Глицинин A1aBx, фрагмент 321-495	20,0/8,30

Рисунок 24 – 2ДЭ белковых ингредиентов.

Выявление белков некоторых ингредиентов (соя, яичный белок) вызвало необходимость дополнительной отработки методики в части отработки режимов фракционирования белков в узком градиенте pH (4-6) с целью исключения эффекта наложения некоторых «мажорных» белков семейств тропомиозина/актина мясного сырья на «мажорные» белки соответствующих немышечных добавок.

В результате дополнительно было идентифицировано 2 мажорных белковых фракции, которые оказались изоформами глицинина (рисунок 24, стрелка 1 и 2).

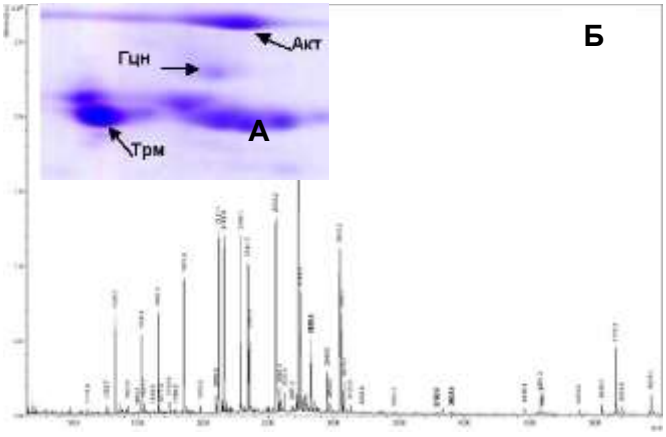
Для исследования возможности выявления добавок растительного сырья и других белковых добавок был исследован образец вареной колбасы «Любительская традиционная» производства по ТУ 9213-037-51032326-03, содержащей мясо птицы, говядину, соевые добавки, крахмал, сывороточный белок, пшеничную клетчатку и вкусовые добавки. Сравнение полученных 2ДЭ колбасы «Любительская традиционная» с эталонными показало наличие ряда дополнительных белковых фракций (рисунок 25).



1–Глицинин A1aBx (фрагмент 321-495) (Glycine max)
2–Глицинин A1aBx (фрагмент 321-496) (Glycine max)
3–Фосфоглицерат мутаза 1 (*Gallus gallus)*
4–Глицинин A1aB1b мутантная субъединица (Glycine max) [Ген *Gy1*]
5–Смесь Глицинина A1aB1b мутантной субъединицы и Глицинина G2 (Glycine max) [ген *LOC547900*]
6–Смесь Глицинина A1aB1b мутантной субъединицы и Глицинина G2 (Glycine max)
7–Глицинин (Glycine max)
8–Субъединица α β-Конглицинина (Glycine max) [ген *LOC547909*]
9–Субъединица α β-Конглицинина (Glycine max)
10–Мышечная Пируваткиназа (*Gallus gallus*)

Рисунок 25 – 2ДЭ белков колбасы «Любительская традиционная».

Стрелками с номерами обозначены все идентифицированные дополнительные белки по сравнению с эталоном.



А – Фрагмент 2ДЭ с идентифицируемой фракцией Гцн и двумя реперными фракциями Акт (актин *Sus scrofa*) и Трм (Тропомиозин *Sus scrofa*).

Б – Масс-спектр триптических пептидов, полученный при MALDI-TOF MS идентификации фракции Гцн как глицинин *Glycine max*

Рисунок 26 –Протеомная идентификация соевого белка глицинина в колбасе «Любительская традиционная».

Полученные результаты позволили локализовать на электрофореграммах положение пятен мышечной пируваткиназы, альфа субъединицу митохондриальной АТФ синтазы индейки, мышечной КФК курицы, а также продуктов разных генов глицинов сои, как совпадающие с наиболее мажорными белками соевого текстурата, так и продукты других генов глицинина сои. Учитывая, что количество суммарного белка в колбасе «Любительская традиционная» практически идентично эталону, белки сои вносят существенный вклад в белковый пул вареных колбас, и протеомные технологии позволяют их обнаружить.

Глава 6. Практическое применение протеомной стратегии при идентификации тканеспецифичных веществ белковой природы с целью подтверждения аутентичности мясного сырья

Протеомные исследования, проведенные в период с 2011 по 2018 гг, различных образцов мясного сырья, показали, что на всех получаемых 2ДЭ присутствуют фракции, которые были приняты в качестве опорных – биомаркеров. И идентифицированы как мажорные мышечные белки: α- и β-тропомиозины, структурные МЛЦ-1, фосфорилируемые МЛЦ-2, изоформы β-енолазы и КФК, альдолазы А и Г3ФД, миоглобины. Выбранные биомаркеры используются для оценки содержания мышечных белков в мясном сырье и продуктах на мясной основе. По полученным данным систематизирована информация с помощью методов биоинформатики, по определенным ранее подходам идентификации искомых биомаркеров с помощью биоинформационных ресурсов позволивших выработать **алгоритм идентификации видоспецифичных белков мясного сырья убойных сельскохозяйственных животных и птицы** (рисунок 27).

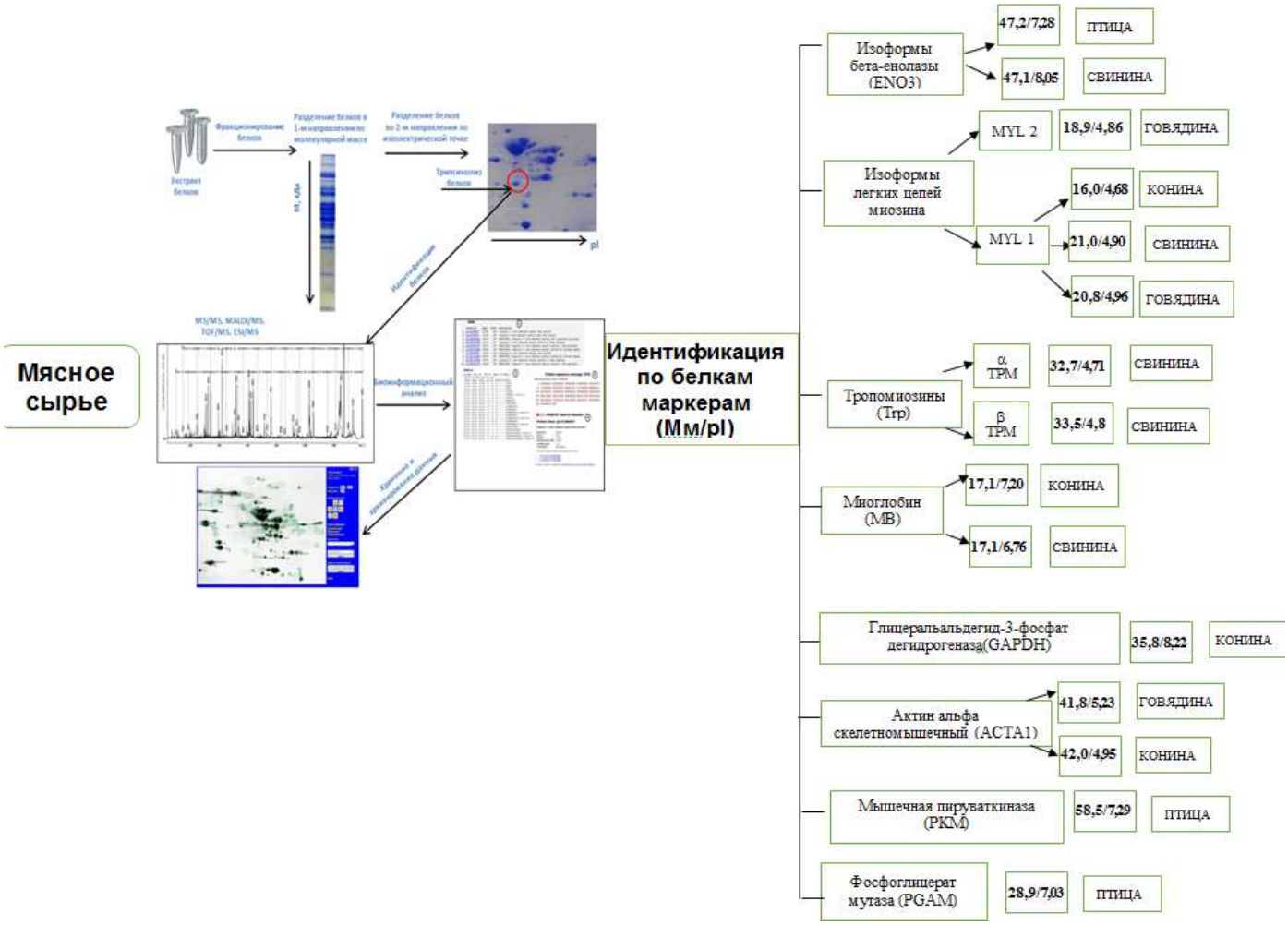


Рисунок 27 – Алгоритм идентификации видоспецифичных белков структурных мышц убойных сельскохозяйственных животных и птицы.

Таким образом, можно сделать вывод о высоком потенциале протеомных стратегий как инструмента изучения особенностей и механизма биотрансформации белков животных тканей. В результате исследований определены предпосылки создания методик идентификации белков животного и растительного происхождения по специальным маркерам.

7. Разработка процедуры выявления и идентификации ткане- и видоспецифичных белков мясных продуктов с применением биоинформационных подходов

При применении биоинформатики для идентификации протеома на первом этапе проводится автоматическое программное изучение изображений 2ДЭ, в результате которого программа находит окрашенные пятна, и придает очертание по их окрашенной площади. Промежуточный результат такого компьютерного анализа представлен на рисунке 28. Далее в автоматическом программном анализе изображений ДЭ происходит построение на этой основе трехмерных моделей. Ключевые характеристики включают: интенсивность изображения

(окрашивания), площадь, объем пятна, процент объема идентифицированного пятна от суммарного объема идентифицированных пятен (рисунок 28).

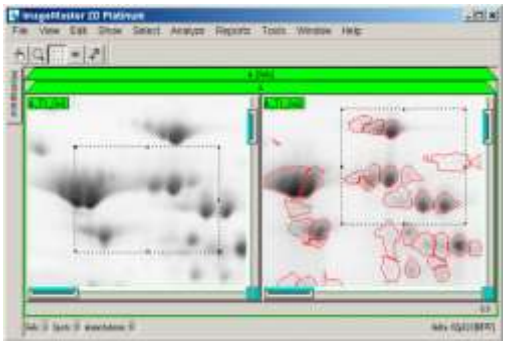


Рисунок 28– Промежуточный результат компьютерного анализа изображений 2ДЭ, который представляет собой автоматическое выявление окрашенных фракций (пятен)

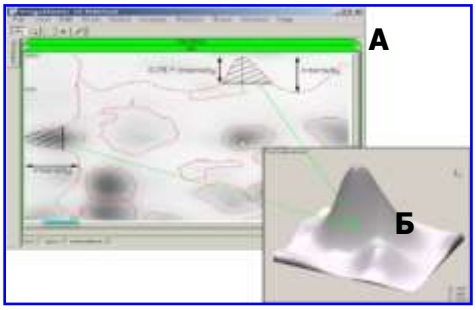


Рисунок 29 – Основные шаги в решении задачи построения трехмерной модели. А - Стрелками указаны: разница при расчетах параметров интенсивности, площади и объема(100*75). Б - Трехмерная модель пятна представленная в виде пика

На рисунке 30 в качестве примера представлены результаты компьютерной денситометрии мажорных фракций выбранных биомаркеров мышечной ткани свинины и говядины на примере вареных колбасных изделий, а именно: МЛЦ структурные и МЛЦ фосфорилируемые.

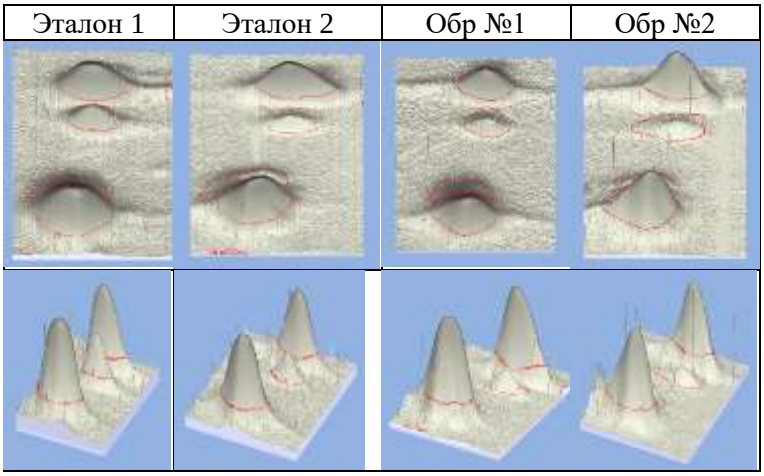


Рисунок 30 – Зоны определённых маркерных белков свинины при помощи методов компьютерной денситометрии, где по МЛЦ 1 и МЛЦ 2 в различных мясных продуктах.

В результате проведенной денситометрии были выявлены отличия в маркерных белках МЛЦ эталонов и образцов из торговой сети. Так в эталонных образцах соотношение холмов находилось приблизительно на одном уровне, а в образцах из торговой сети наблюдались явные различия.

Данный биоинформационный прием позволил заложить основу для количественной идентификации выбранных биомаркеров мышечной ткани.

Проведение биоинформационной интерпретации полученных результатов позволило сформулировать и значительно расширить подходы к идентификации и количественному определению белковых маркеров качества, функциональности и безопасности мясного сырья (выявления фальсификации) в готовых мясных продуктах. По полученным данным систематизирована информация с помощью методов биоинформатики, позволившая создать уникальный программный комплекс – атлас «Протеомные карты мяса и мясных продуктов», включающий в свой состав протеомные карты, таблицы идентифицированных белков, и соответствующие им масс-спектры, а так же выявленные маркерные белки видоспецифичности и автолитические маркеры качества. Атлас будет периодически пополняться новой информацией.

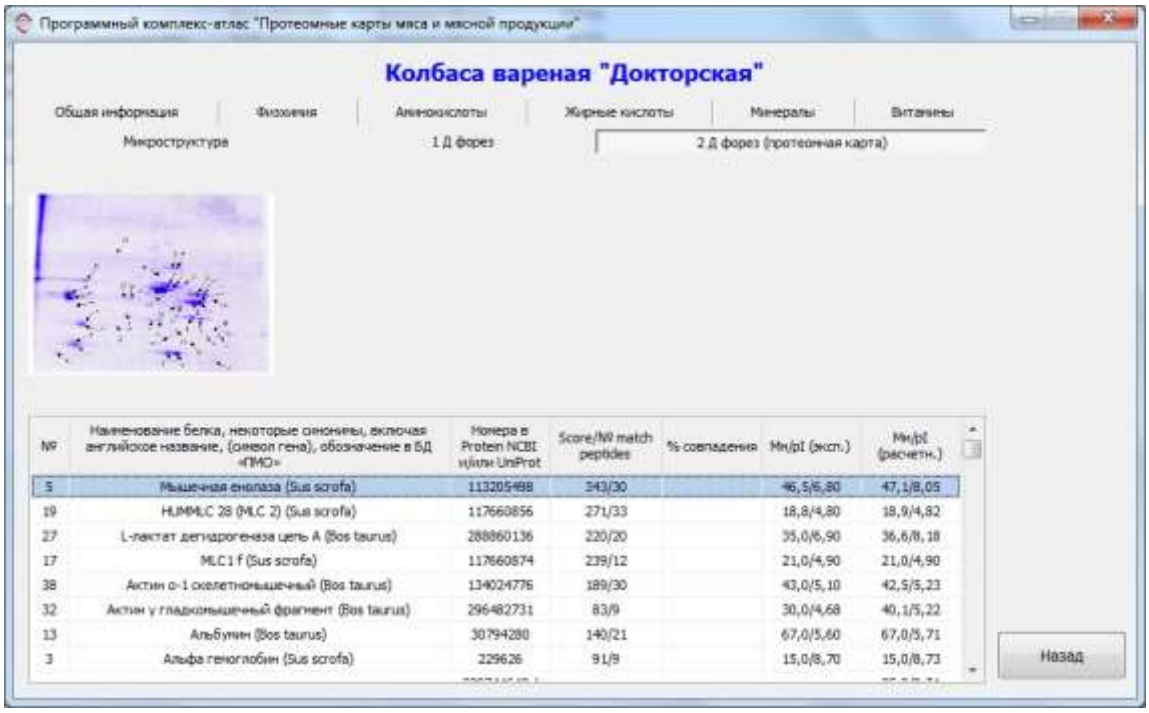


Рисунок 31 – Фрагмент программного комплекса – атласа «Протеомные карты мяса и мясных продуктов».

Разработанный програмный комплекс (атлас) протеомных профилей основных белков и биомаркеров мяса и мясной продукции и сформированный алгоритм проведения исследований белков и пептидов мясного сырья позволили заложить основу по разработке интерфейса (программной оболочки) информационной системы и многоуровневой структуры базы данных мясных отечественных продуктов, в Госзадании по плану научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, выполняемых в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013 – 2020 годы. Завершающим этапом работы по разработке научно-практической модели выявления и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы в мясной продукции и по полученным данным с помощью методов биоинформатики, алгоритмам и модели идентификации

систематизирована информация, которая вошла в Информационные модули отечественной БД «ПМО» (зарегистрирована в Государственном реестре баз данных, регистрационный номер 2013620315 от 20.02.2013) (рисунок 32).

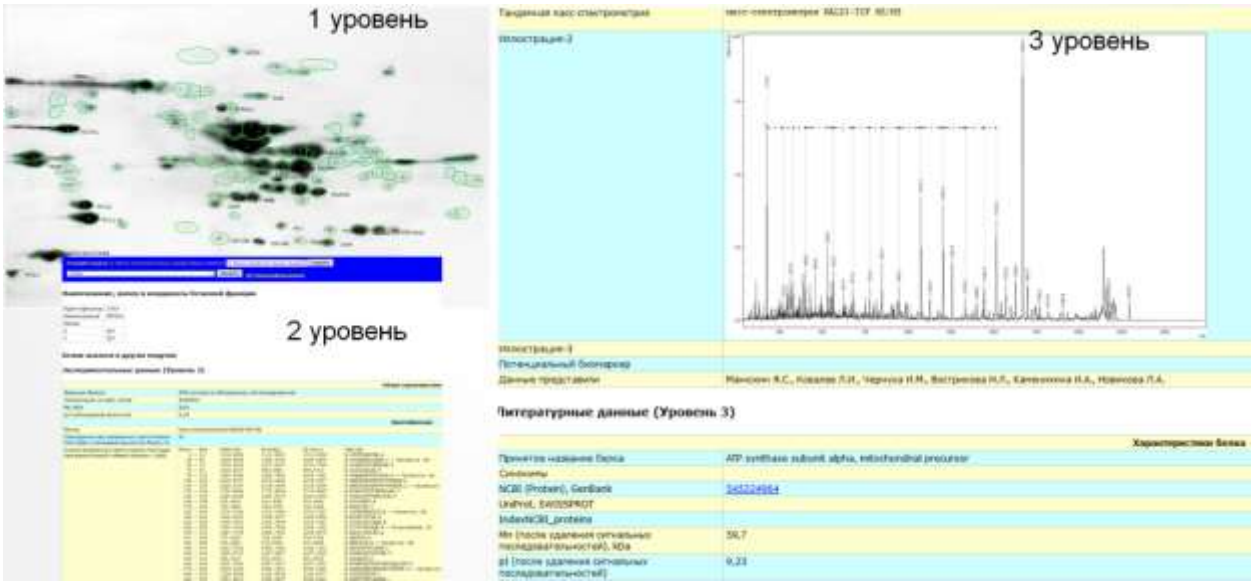


Рисунок 32 – Информационный модуль «Белки скелетной мышцы отечественной БД «ПМО».

При этом метод позволяет количественно выявить не только мышечные, но и прочие белки растительного и животного происхождения (рисунок 33).

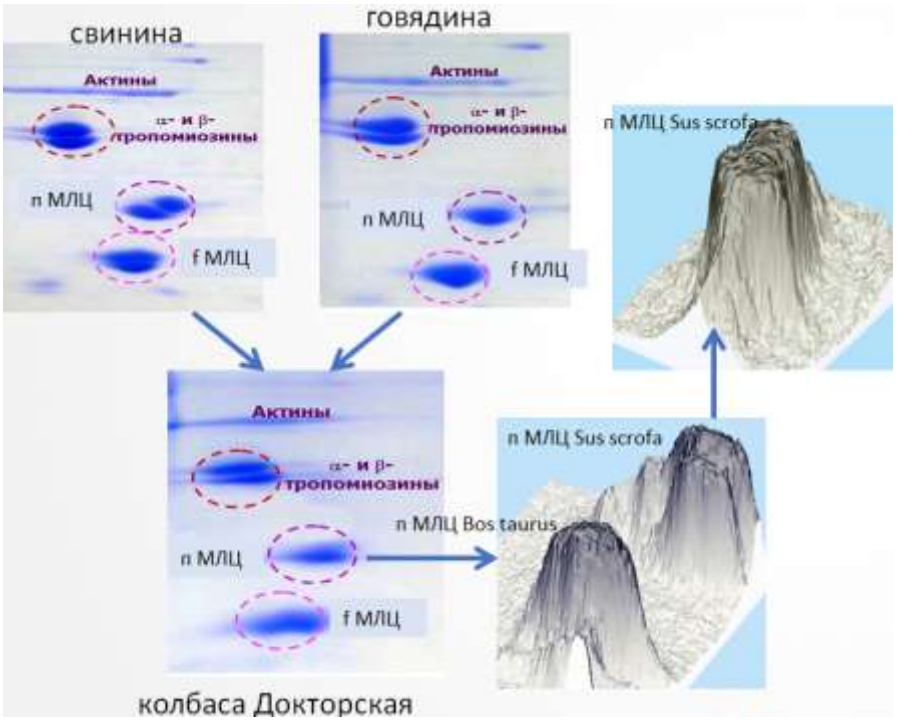


Рисунок 33 – Фрагменты 2ДЭ белков из образцов *m.l.Dorsi* свинины, говядины и колбасы Докторская, трехмерные модели фракций МЛЦ структурные и МЛЦ фосфорилируемые, пунктирными овалами выделены маркерные белковые фракции.

Проведенный сравнительный количественный анализ показал, что в эталонных образцах вареных колбас содержание отмеченных маркерных белковых фракций на 2ДЭ дает практически постоянную величину.

Очевидно, что присутствие в анализируемых образцах значимых количеств белков не мышечного происхождения должно приводить к уменьшению полученного показателя и по измеренному изменению показателя очевидно можно оценить величину присутствующих не мышечных белков.

Таким образом, представленные данные и алгоритмы работы, а также полученные результаты свидетельствуют о том, что собранные экспериментальные и литературные материалы позволили заложить основу для разработки метода определения количественного содержания мясных белков в бесструктурных мясных изделиях, в частности, в вареных колбасных изделиях.

В основе метода **качественного и количественного определения доли мышечных белков в мясных продуктах** лежит применение комплекса протеомных технологий, включающих двумерный электрофорез в полиакриламидном геле и масс-спектрометрическую идентификацию подтверждения мажорного белка выбранного в качестве биомаркера для определенного вида мышечной ткани животного или птицы, используя алгоритм (рисунок 27). В результате проведенной денситометрии эталонных образцов маркерных фракций белков суммарно соотношение свинина/говядина было оценено в величине объемной доли фракции от суммы всех выявленных фракций (M±m таблица 4). Таким образом, полученные средние значения объемной доли фракции для пяти биомаркеров практически совпали в свинине и говядине.

Принципиально иные результаты были получены при расчетах миоглобина. Объемная доля фракции миоглобина показала соотношение свинина/говядина (в величинах M±m) как 38,3±0,5/62,0±0,5(рисунок 34).

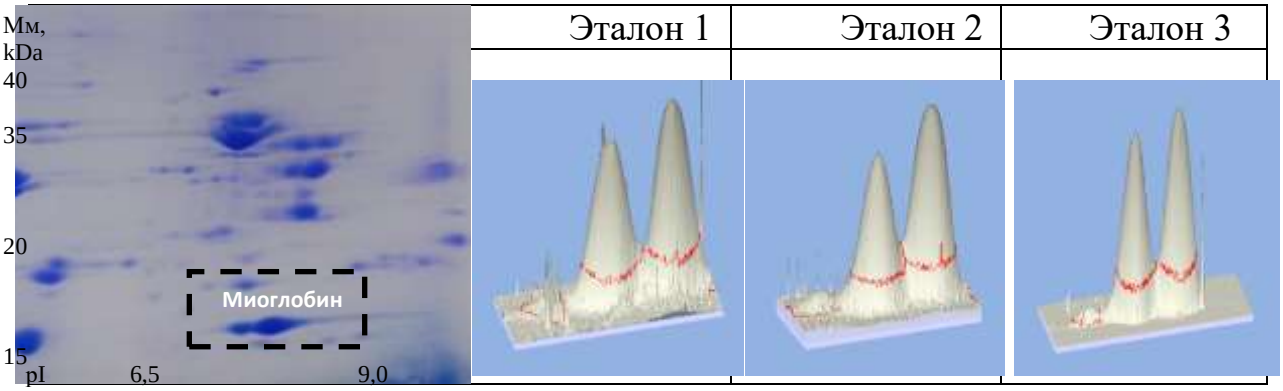


Рисунок 34 – Соотношение потенциального биомаркера миоглобина в опытных образцах.

Исходя из сведений о реальном соотношении мясного сырья в продуктах относительно общепринятых рецептур в специально изготовленных эталонных образцах свинина/говядина, был рассчитан соответствующий поправочный коэффициент (Кп), который для определения содержания данного мажорного белка в свинине оказался равным 0,67 ед. OD/C (где ед.OD – величина оптической плотности фракции свиного миоглобина, измеренной при компьютерной

денситометрии, а С – содержание этого белка в условных единицах). Аналогично Кп для говяжьего миоглобина был определен величиной 1,5 ед. OD/C.

После коррекции результатов определения миоглобина с помощью рассчитанных Кп соотношение свинина/говядина в эталонных образцах было оценено величинами (в %), представленными в таблице 4. Соответственно, суммарно по трем эталонам этот показатель составил – 39/61 и практически совпал с оценками, сделанными по другим видоспецифичным биомаркерам. Таким образом, в исследуемых образцах отсутствовало заявленное соотношения мясного сырья в соответствии с рецептурным составом. В итоге в соответствии с Протеомным паспортом Докторской колбасы суммарно по пяти выбранным биомаркерам соотношение свинина/говядина, установлено: 60:40; по миоглобину 40:60 (таблица 4 Эталон1-3).

Последующий анализ соотношения свинина/говядина в четырех образцах мясных продуктов, приобретённых в торговых сетях, по выбранным видоспецифичным биомаркерам, представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты количественного определения мышечнотканного белка по видоспецифичным биомаркерам

Маркерный белок	Среднее соотношение массовой доли мышечной ткани свинина/говядина, в образцах вареных колбас %						
	Эталон 1	Эталон 2	Эталон 3	Обр. 1	Обр. 2	Обр. 3	Обр.4
β-енолаза	59/41	60/40	57/43	55/45	55/45	52/48	49/51
КФК	60/40	61/39	58/42	55/45	64/36	52/46	61/39
фракции α-тропомиозинов	58/42	57/43	57/43	48/52	50/60	51/49	40/60
структурные МЛЦ	61/39	59/41	59/41	55/45	50/50	53/47	60/40
фосфорилируемые МЛЦ	58/42	59/41	58/42	50/50	54/46	60/40	58/42
альдолаза А	60/40	59/41	61/39	58/42	44/56	58/42	61/39
ГЗФД	59/41	57/43	58/42	49/51	33/67	42/68	40/60
миоглобин	38/62	40/60	39/61	47/53	53/47	60/40	55/45

Таким образом, несмотря на выявленную некоторую вариабельность результатов (эталонных образцов) измерений, обобщенные результаты оказались достаточно близкими и стремились по соотношению свинина/говядина, выбранных маркеров по: β-енолазе, КФК, тропомиозинам, МЛЦ, альдолазе А и ГЗДФ к 60:40; миоглобину к 40:60, и свидетельствовали о значительном отклонении в соотношении сырья. Тогда как в образцах из торговой сети был выявлен значительный разброс данных маркеров по соотношениям свинина/говядина по: β-енолазе, КФК, тропомиозинам, МЛЦ, альдолазе А и ГЗДФ от 33 до 64 – в свинине и от 36 до 68 – в говядине, миоглобину от 47 до 60 – в свинине и от 45 до 53 – в говядине.

В результате комплексных исследований представленных в диссертационной работе, была сформированная интегрированная модель действий по выявлению, изучению и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы животного происхождения для подтверждения состава и аутентичности мясной продукции (рисунок 35).

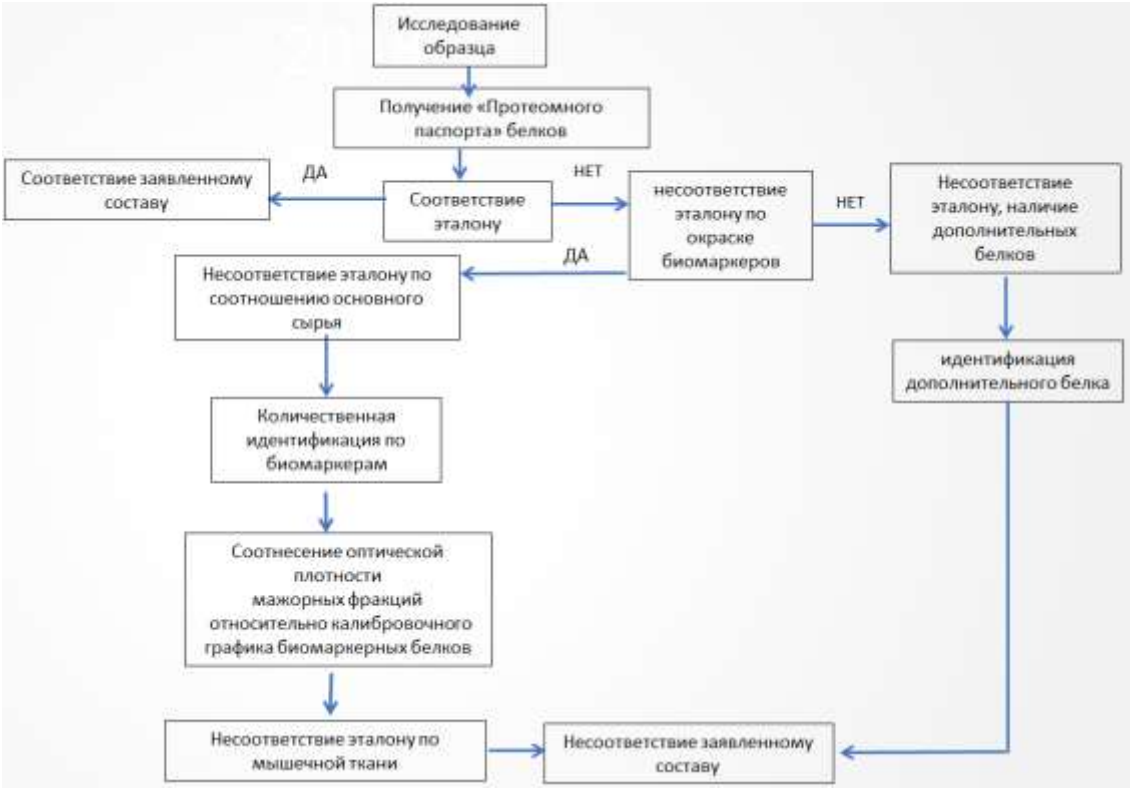


Рисунок 35 – Интегрированная модель действий по выявлению, изучению и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы животного происхождения для подтверждения состава и аутентичности мясной продукции.

Очевидно, что аналогичные подходы применимы для всей мясной продукции, в составе которой содержатся белки мышечного происхождения. Таким образом, предложенная методология может найти достаточно широкое применение относительно различных задач стоящих перед научным сообществом относительно практического внедрения результатов их деятельности с получением конкретного результата. Прикладная протеомика, направленная на нахождение биомаркеров, состава объектов растительного и животного происхождения, различного состояния животных перед убоем, функционально-технологических свойств мясного сырья и идентификационных признаков аутентичности продукции, а так же анализа белков и пептидов, образующихся в процессе эндогенного или экзогенного воздействия собственными тканевыми ферментами животных и изучения механизмов изменения протеома для направленного формирования характеристик качества животного, белковый состав которого обладает широким динамическим диапазоном масс пептидов и их фрагментов, модификаций, в том числе агрегаций, требует совсем другой подход, чем классический анализ белка, например, где потребуется более подробное исследование или полное картирование последовательности известного

белка. Наиболее перспективным подходом к выявлению и подтверждению биомаркеров является мониторинг множественной реакции (MRM-MS). Метод представляет собой MS/MS режим, который уникален для тройных квадрупольных (QQQ) MS-приборов, способный к быстрому, чувствительному и количественному определению целевого аналита, при использовании знаний представленных в данной работе, он позволит решить вышеперечисленные вопросы. Имея методику количественного определения белков, мы получаем инструмент для изучения механизма формирования таких функционально-технологических характеристик мяса как влагосвязывающая способность, нежность, pH.

Глава 8. Научно-производственная апробация результатов исследований и оценка экономической эффективности внедряемых методов.

В результате проведенных исследований разработан комплексный подход к выявлению и идентификации видо- и тканеспецифичных веществ белковой природы при контроле мясного продукта. Предложенная протеомная стратегия в исследовании формирования качественных показателей мясного сырья для идентификации белкового состава мясной продукции и разработанные методы позволяют определять видовую и тканевую принадлежность образцов мясного сырья и количественно определять в мясных продуктах белковые и небелковые компоненты, а также выявлять наличие добавок растительного и животного происхождения, в продуктах, подвергшихся термической обработке. Результаты работы отражены в патенте «Способ подтверждения аутентичности вареных колбасных изделий». Результаты используются при проведении лекционных и практических занятий в рамках повышения квалификации для специалистов мясной отрасли в Учебном центре ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН, АНО ДПО «МТИМП», а также при подготовке магистерских и дипломных работ на базовой кафедре ФГБОУ ВО МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ) и в курсе лекций «Методы контроля качества мясной продукции», на кафедре управления качеством и товароведение продукции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Разработанный программный комплекс – атлас «Протеомные карты мяса и мясных продуктов», электрофореграмм и денситограмм фракционного состава использован при идентификации вида образцов мышечной ткани сельскохозяйственных животных и птицы, а также для выявления не заявленных ингредиентов мясного сырья в рамках работы при разработке обучающей программы совместно с Фондом инфраструктурных и образовательных программ при разработке дополнительной профессиональной образовательной программы повышения квалификации по теме «Выявление фальсификации состава продуктов молекулярно-генетическими методами» на учебном портале еНано. Так же результаты данного блока исследований вошли в практический курс повышения квалификации химиков-аналитиков производственных лабораторий в рамках АНО ДПО «МТИМП».

Разработанная методика измерений МИ –1/2016 Ф «Определение

качественного содержания белков методом 1D – электрофореза» вошла в ГОСТ 33692-2015 Белки животные соединительнотканные. Общие технические условия (п.7.9 Определение молекулярной массы белка) для установления функционально-технологической градации животных соединительнотканных белков. Методика измерений МИ –2/2018 Ф «Определение количественного содержания мясных белков методом 2D – электрофореза» апробирована на 5 мясоперерабатывающих предприятиях и в условиях лабораторий Биомедицинских исследований ФИЦ Биотехнологии РАН, НИУ МГУ ТУ им.Н.Э.Баумана и лаборатории биоаналитических исследований ФГБУН НЦБМГ ФМБА России.

Разработанный программный комплекс (атлас) протеомных профилей основных белков и биомаркеров мяса и мясной продукции и сформированный алгоритм проведения исследований белков и пептидов мясного сырья позволили заложить основу по разработке интерфейса (программной оболочки) информационной системы и многоуровневой структуры базы данных мясных отечественных продуктов, в Госзадании по плану научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, выполняемых в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013 – 2020 годы.

Оценка экономической эффективности внедряемых методов была проведена в соответствии с общепринятыми методами лабораторной практики (гистологическая идентификация и ПЦР) и экономической модели оценки затрат в рамках анализа рисков. Стоимость анализа составляет 115,1 руб. Предложенный метод не требует дорогостоящего оборудования и может быть внедрен как в научных, так и производственных лабораториях. Экономическая модель затрат на устранение факта фальсификации должна также охватывать все основные и вспомогательные материалы при производстве продукта.

Выводы:

Систематизированы, формализованы и модифицированы существующие подходы по методологии использования протеомных, масс-селективных и хроматографических методов для анализа компонентного состава мясной продукции, в том числе и белковых растительных ингредиентов.

2.Разработаны научно-практические основы системной протеомной стратегии идентификации белкового состава мясного сырья и аутентичности мясной продукции, как инструмент решения задач по:

а) изучению протеомного состава объектов растительного и животного происхождения,

б) выявления биомаркеров различного состояния животных перед убоем, функционально-технологических свойств мясного сырья и идентификационных признаков не соответствия составу,

в) качественной и количественной идентификации состава для подтверждения аутентичности вареных мясных изделий,

г) изучению механизмов изменения протеома для направленного формирования характеристик животного сырья.

3. Идентифицированы мышечные белки основного сырья (говядина, свинина, конина, верблюжатина и птица) и белки, входящие в состав добавок и ингредиентов. Всего по полученным 2ДЭ белков m.l.Dorsi животных и мяса птицы было определено/идентифицировано методом MALDI-TOF MS: в свинине – 145/108, в верблюжатине –170/114, в говядине – 115/51, в конине – 130/61, курице – 58/32, индейке – 72/37 белка.

4.Обоснованы и экспериментально подтверждены ткане- и видоспецифичные различия белков животных тканей.

5.Установлена возможность изучения с помощью протеомных технологий изменения мышечных белков мясного сырья (свинины и говядины) при созревании мяса, в различных условиях (аэробное и анаэробное хранение), в том числе принадлежащих к различным группам качества. Определены биомаркеры автолитических изменений и пороков качества.

6.Выявлены специфичные биомаркеры мышечной ткани сельскохозяйственных животных (говядина, свинина, конина, верблюжатина), и птицы (курица, индейка). Показана универсальность идентифицированных маркеров и возможность их применения для широкого ассортимента термообработанных бесструктурной и структурной вареной мясной продукции, с учетом наличия белковых ингредиентов не мышечного происхождения. Сформирован алгоритм проведения исследований белков и пептидов мясного сырья с учетом аспектов протеомной стратегии исследования качественных показателей для установления аутентичности мясной продукции.

7.Разработана схема построения протеомных карт и спектров выявленных белков и пептидов мяса и мясной продукции (на примере вареных колбасных изделий) при помощи биоинформационной обработки данных, и сформирован програмный комплекс – атлас «Протеомные карты мяса и мясных продуктов» в качестве основного инструмента подтверждения уникального наименования стандартизированной российской мясной продукции.

8. Проведена научно-производственная апробация. Методика измерений МИ –1/2016 Ф «Определение качественного содержания белков методом 1D – электрофореза» вошла в ГОСТ 33692-2015 Белки животные соединительнотканные. Общие технические условия; МИ –2/2018 Ф «Определение количественного содержания мясных белков методом 2D – электрофореза» апробирована в 3 исследовательских и 5 производственных лабораториях. Разработан практический курс для слушателей повышения квалификации химиков производственных лабораторий, а также лекции «Методы контроля качества мясной продукции» для студентов, бакалавров и магистрантов ВУЗов и обучающяя программа ДПО по теме «Выявление фальсификации состава продуктов молекулярно-генетическими методами» на учебном портале еНано.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации:

Книги

1. Мясная промышленность. Энциклопедический словарь / Сост.: А. Б. Лисицын, И. М. Чернуха, А. А. Семенова, Л. С. Кудряшов, В. Б. Крылова, А. В. Устинова, А. Н. Иванкин, С. И. Хвыля, Ю. Г. Костенко, Т. Г. Кузнецова, В. В. Насонова, Е. К. Туниева, А. С. Дыдыкин, О. К. Деревицкая, **Н. Л. Вострикова**, и др.– М.: ВНИИМП, 2015. – 256 с.

2. Иванкин А. Н., Олиференко Г.Л., Беляков В.А., **Вострикова Н.Л.** Физико-химические методы анализа. Спектрометрия: учеб. пособие.– М.: МГУЛ, 2016. – 127 с.

Статьи в изданиях, рецензируемых в международных базах данных(Scopus и WOS)

3. Чернуха, И.М. Образование биологически активных пептидов в мясном сырье под влиянием протеаз различного происхождения/ И.М. Чернуха, Н.Г. Машенцева, **Н.Л. Вострикова** и др. //Сельскохозяйственная биология, 2018, 2018, том 53, № 6, с. 1247-1261. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.6.rus.

4. **Vostrikova, N L** Identification of Tissue-Specific Proteins and Peptides Forming Innovative Meat Products Corrective Properties to Confirm Authenticity of Meat Raw Materials / N.L. Vostrikova, I. M. Chernukha // Foods and Raw Materials. – 2018.– V.6.– № 1. – pp. 201–209. DOI: 10.21603/2308-4057-2018-1-201-209.

5. **Vostrikova, N.L.** Determination of muscular tissue proteins by 2D electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry / N.L. Vostrikova, A.V. Kulikovskii, I.M. Chernukha, L.I. и др. // Zhurnal Analiticheskoi Khimii. – 2017. – Vol. 72. – No. 10. – pp. 932–943.DOI: 10.1134/S1061934817100173

6. Study and identification of main proteins and peptides to determine the content of muscle protein in structureless cooked products by the method of two-dimensional electrophoresis followed by the time-of-flight mass spectrometry identification / **N.L. Vostrikova**, I. M. Chernukha, A.V. Kulikovskiy, and S.S. Shishkin // Foods and Raw Materials.– 2016. – V. 4, № 2. – P. 136 – 147. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-136-147

7. **Vostrikova, N L** Identification of species- and tissue-specific proteins using proteomic strategy/I. M. Chernukha, N.L. Vostrikova, L.I. Kovalev et al. // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 59th International Meat Industry Conference, MEATCON 2017; Mt. Zlatibor; Serbia; 1 October 2017. – Volume 85. – Issue 1. DOI:10.1088/1755-1315/85/1/012006

8. Denaturation of collagen structures and their transformation under the physical and chemical effects/ Ivankin A., Boldirev V., Fadeev G., Baburina M., Kulikovskii A., Vostrikova N.// IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series. – 2017.– 918. DOI: 10.1088/1742-6596/918/1/012010.

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

9. **Вострикова, Н.Л.** Идентификация мясного сырья методом пептидного фингерпринта / Вострикова Н. Л. Чернуха И. М., Куликовский А. В. // Все о мясе. – 2017.– №4. – С.43 – 47.

10.Становова, И. А. Методические подходы к определению количественного содержания коллагена в животных белках /Становова И. А., **Н. Л. Вострикова**, А. А. Курзова и др. // Все о мясе. – 2017. – № 3. – С. 11– 13.

11. Николаева А.С. Метрология аналитического контроля эссенциальных компонентов пищевой продукции / А.С. Николаева, А.Н. Иванкин, **Вострикова Н.Л.** и др. // Все о мясе. – 2017. – № 2. – С. 5–9.

12. Оценка биологической ценности мясного белка при хранении замороженного мяса/ Князева А.С., **Вострикова Н.Л.,** Иванкин А.Н., Куликовский А.В.// Все о мясе. – 2017. – № 2. – С. 36 – 39.

13. Иванкин, А.Н. Кинетические особенности энзиматической деградации животного белка/ А.Н. Иванкин, **Н.Л. Вострикова**, А.В. Куликовский и др.// Все о мясе. – 2016. – № 6. – С. 3 – 7.

14. Манюхин, Я.С. Изучение белков мышечной ткани верблюда (*Camelus bactrianus*) с использованием протеомных технологий / Я.С. Манюхин, И.М. Чернуха, **Н.Л. Вострикова** и др. // Все о мясе. – 2016. – № 6. – С. 35–40.

15. Чернуха, И.М. Протеомика как инструмент для изучения качества мяса / И.М. Чернуха, **Н.Л. Вострикова**, Я.С. Манюхин // Все о мясе. – 2016. – №1. – С.46 – 49.

16. Убойные и технологические качества свиней разных пород Сибири / В.А. Бекенев, И.М. Чернуха, **Н.Л. Вострикова** и др. // Главный зоотехник. – 2015. –№10. –С.44– 51.

17. Формирование сырокопченой колбасы под влиянием стартовых культур / А.И. Рогатин, А.А. Семенова, **Н.Л. Вострикова** и др. // Все о мясе. – 2014.– № 1. – С. 24– 26.

18. Изучение фракционного состава белков мяса в процессе длительного холодильного хранения / А.Б. Лисицын, А.Н. Иванкин, **Н.Л. Вострикова,** И.А. Становова // Все о мясе. – 2014. – № 2. – С.36– 42.

19. Протеомное исследование количества мышечной ткани в образцах вареных колбас / М. А. Ковалева, Л. И. Ковалев, **Н. Л. Вострикова** и др.// Все о мясе. – 2013. – №1. – С.18– 21.

20. Экстрактивные вещества сухих бульонов из вторичного животного сырья / М.И. Бабурина, А.Н. Иванкин, **Н.Л. Вострикова и** др. // Все о мясе. – 2013.– № 2. – С. 18 – 22.

21. Изучение полноценности белков в разных типах мышц говядины / **Н.Л. Вострикова**, А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, А.Н. Иванкин // Все о мясе. – 2013.– № 2. – С. 34– 40.

22. **Вострикова, Н.Л.** Наши компетенции: качество и безопасность продукции / Н.Л. Вострикова // Все о мясе. – 2013.– № 5. – С. 54.

23. Иванкин, А.Н. Обогащенный лизиновый премикс из животного сырья / А.Н. Иванкин, М.И. Бабурина, **Н.Л. Вострикова** // Мясная индустрия. – 2012. – № 3. – С.47 – 51.

24. Протеомные технологии в исследованиях белкового состава вареных колбасных изделиях / **Н.Л. Вострикова**, И.М. Чернуха, А.Б. Лисицын и др. // Все о мясе.– 2012.– № 2. – С. 35– 42.

Материалы симпозиумов, конгрессов, конференций

25. Изучение воздействия эндогенных ферментов на ткани животных при автолитических изменениях методом хроматомасс-спектрометрии / **Вострикова Н.Л.,** Чернуха И.М., Куликовский А.В., Хвостов Д.В. // Микробные технологии в птицеводстве и животноводстве: сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции. – Казань. – 2018. – 36 с.

26.Выявление маркеров агрегации белков в мясном сырье и готовых продуктах/ И.М. Чернуха, Л.И. Ковалев, Н.Г. Машенцева, М.А. Ковалева, **Н.Л. Вострикова** // Инновации в пищевой биотехнологии: сборник трудов Международного симпозиума ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет».– Кемерово, 2018.– 541 с.

27. **Vostrikova, N.L.** PROTEOMICS AS A TOOL FOR STUDYING MEAT AUTOLYSIS / N.L. Vostrikova, I.M.Chernukha, N.G. Mashentseva, A.V. Kulikovskii, A.N. Ivankin and A.G.Achremko // 63 rd International Congress of Meat Science and Technology 13-18 August,2017, Cork, Ireland.– P.870-873

28. Определение развариваемости коллагена, как показателя модификации низкосортного мясного сырья, с высоким содержанием пищевых волокон/ И.А. Становова, А.Н. Иванкин, Курзова А.А., **Н.Л. Вострикова** // «Продовольственная безопасность в контексте новых идей и решений» международная научно-практическая конференция. 10 марта 2017 г. – Семей: Государственный университет имени Шакарима, 2017. – Том 1. С.425–427.

29. Денатурация коллагеновых структур и их трансформация / А.Н. Иванкин, В.С. Болдырев, Г.Н. Фадеев, **Н.Л. Вострикова** // Материалы Девятой Всероссийской конф. «Необратимые процессы в природе и технике», Москва, 25–27 января 2017 года. – М.: НИУ МГТУ им. Н.Э. Баумана. Ч.2.– С.9-12,

30. Использование биоинформатики при интерпретации протеомных профилей белков мяса / **Н.Л. Вострикова**, И.М. Чернуха, С.С. Шишкин, Я.С. Манюхин // Практические и теоретические аспекты комплексной переработки продовольственного сырья и создания конкурентоспособных продуктов питания - основа обеспечения импортозамещения и продовольственной безопасности России. 19-ая междун. науч.-практ. конф. памяти В.М. Горбатова. 8-9 декабря 2016 г. – М.: ВНИИМП им. В.М. Горбатова, 2016. – С. 78 – 82.

31. Formation of organoleptic properties of “braunschweigskaya” sausage under the influence of starter cultures Proc. / A.A. Semenova, A.N. Ivankin, **N.L. Vostrikova** et al. // The 61th International Congress of Meat Science and Technology.– Polydome - Clermont-Ferrand(France), 2015.– P. 8.1

32. Manyukhin, Y.S., Identification of pork, beef and horse meat using proteomics / Y.S. Manyukhin, I. M. Chernukha, **N. L Vostrikova** // BEZPEČNOSŤ A KONTROLA POTRAVÍN / Zborník prác z XII. medzinárodnej vedeckej konferencie.– Smolenice, 2015.

33. Изменение фракционного состава белков свинины при длительном холодильном хранении / А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, **Н.Л. Вострикова**, Н.А. Горбунова // сб. науч. тр к 85-летию ВНИХИ. – М.: Изд-во ФГБНУ ВНИХИ, 2015. – С.199– 203.

34. Масс-спектрометрическая идентификация химических компонентов вкусо-ароматической гаммы мясной продукции / А.Н. Иванкин, А.Б. Лисицын, **Н.Л. Вострикова**, А.В. Куликовский // Теоретические и практические аспекты управления технологиями пищевых продуктов в условиях усиления международной конкуренции: сб. докл 17-ой междунар. науч.-практ. конф. памяти В.М.Горбатова. – М: ВНИИМП, 2014. – С. 77–80.

35. Изучение фракционного состава белков говядины в процессе длительного холодильного хранения / А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, **Н.Л. Вострикова**, Н.А. Горбунова // Пути интенсификации производства и переработки сельскохозяйственной продукции в современных условиях: матер. всеросс. науч.-практ. конф.– г. Волгоград: Волгоградское научное изд-во, 2014.– вып. 2. – С.151– 154.

36. **Вострикова, Н.Л.** Влияние длительного холодильного хранения на аминокислотный состав мяса / Н.Л. Вострикова, Н.А. Горбунова // Инновационные технологии в производстве и переработке с/х продукции в условиях ВТО: в 2-х частях. мат. междунар. науч.-практ. конф.– г. Волгоград: ИУНЛ ВолгГТУ, 2013.– С.9-12.

37. Proteomic technologies for protein analysis in cooked sausage / I.M. Chernukha, **N.L Vostrikova**, M.A. Kovaleva, A.V. Ivanov // 58th International Congress of Meat Science and Technology. – Canada, 2012. – A-13.

38. **Вострикова, Н.Л.** Растительные белки - фальсификация мясной продукции и ее выявление / Н. Л. Вострикова, А. Н. Иванкин, Н. А. Горбунова // Пути интенсификации производства и переработки сельскохозяйственной продукции в современных условиях.- Материалы международной научно-практической конференции. Часть 2.– г. Волгоград, 2012.– С.23–24.

39.Чернуха, И.М. Изучение и выявление потенциальных биомаркеров мышечных белков в колбасных изделиях / И.М. Чернуха, **Н.Л. Вострикова**, С.С. Шишкин // Мясная промышленность - приоритеты развития и функционирования.– Материалы 15-й Международной научно-практической конференции памяти В.М. Горбатова.–2012.–Т.2.– С.167–170.

40. **Вострикова, Н.Л.** К проблеме выявления биомаркеров мышечной ткани в мясных продуктах / Н. Л. Вострикова, И. М. Чернуха // Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук. Материалы Всероссийской молодежной научной конференции.–Кемерово, 2011.– С. 16–20.

41. Чернуха, И.М. Изучение протеомных изменений мышечной ткани свинины под воздействием технологических факторов / И. М. Чернуха, О. Е. Усанова, **Н. Л. Вострикова** // Перспективные направления исследований в области переработки мясного сырья и создания конкурентоспособных продуктов питания. Материалы 14-й Международной научно-практической конференции памяти В.М. Горбатова. –2011. – С.239 –248.

42. **Вострикова, Н.Л.** Исследование состава мясного сырья в аспекте современной хроматографии / Н. Л. Вострикова, Ю.К. Юшина, Р.Р. Биктимеров //Инновационные аспекты переработки мясного сырья и создания конкурентоспособных продуктов питания. Материалы 13-й Международной научной конференции памяти В.М. Горбатова.–2010.– С.124–125.

43. Functional animal protein ingredients / A. B. Lisitsyn, A.N. Ivankin, A.D. Neklydov, **N.L Vostrikova** // 55 International Congress of Meat Science and Technology.– Copenhagen, Denmark, 2009. – PE 4.23.

Публикации в других научных изданиях

44.**Вострикова, Н.Л.** Изучение протеома мышечной ткани животных с использованием биоинформатики / Н.Л. Вострикова, И.М. Чернуха// Актуальная биотехнология.– 2018.– №3(26) .– С.323-328.

45.**Вострикова, Н.Л.** Методологические аспекты идентификации тканеспецифичных белков и пептидов, формирующих корригирующие свойства мясных продуктов. Теория и практика переработки мяса/ Вострикова Н.Л., Чернуха И.М., Хвостов Д.В. // Теория и практика переработки мяса .– 2018.– 3(3) .– С.36-55. DOI: 10.21323/2414-438X-2018-3-3-36-55.

46.Микрокомпоненты пищевых систем на основе животного и других видов белков. Обзор / А.Н. Иванкин, **Н.Л. Вострикова**, А.В. Куликовский, Г.Л. Олиференко // Теория и практика переработки мяса.– 2018.– 3(1) .– С.16-28. DOI: 10.21323/2414-438X-2018-3-1-16-28.

47. Identification of Animal Muscle Proteins by 2D-Electrophoresis and Time-of-Flight Mass Spectrometry / **N.L. Vostrikova**, A.V. Kulikovskii, I.M. Chernuha, A.N. Ivankin //Chemical and Biomolecular Engineering 2017.– 2(2) .– 96-105

48. **Вострикова, Н.Л.** Использование инструментов денситометрии при количественных обсчетах белковых фракции / Н.Л. Вострикова // Теория и практика переработки мяса.– 2017.– 3.– С. 49-65. DOI: 10.21323/2414-438X-2017-2-3-49-65.

49. **Вострикова, Н.Л.** Биоинформатика – инструмент интерпретации протеомных профилей белков мяса / Н.Л. Вострикова, И.М. Чернуха // Теория и практика переработки мяса.– 2017.– 1.– С.4-17. doi.org/10.21323/2414-438X-2017-2-1-4-17

50. Baburina, M.I. Defragmenting Processing of Collagen-Containing Wastes of Meat Processing Industry into Functional Feed Additives for Obtaining High-Quality Food / Baburina M.I., **Vostrikova**

N.L., Kulikovskii A.V., Zarubina A.N., Ivankin A.N. // World Journal of Food Science and Technology.– 2017, July.– Vol. 1.– Issue 1.

51. Протеомное исследование мясного сырья, вареных колбас и функциональных мясных продуктов / М. А. Ковалева, Л. И. Ковалев, С. С. Шишкин, **Н.Л. Вострикова** и др. // Современные проблемы науки и образования.– 2013.– №5.– С.8.

52. Nano, Micro Transformations Of Termo Degraded Products Of Wood And Their Influence On The Safety Of Food / A.N. Ivankin, A.V. Kulikovsky, **N.L Vostrikova** et al. // Journal "Scientific Israel-Technological Advantages".– 2013.– Vol.15.– № 2.– P.56– 62.

53. Ivankin, A.N. Biochemical Transformations Of Lipide And Carbohydrat-Protein Nano Complex In Liquid Foodstuff / Ivankin A.N., **Vostrikova N.L.** // International Journal of Food Science and Nutrition Engineering.– 2012.– V. 2(3). P. 27 – 32

Патенты

54. Патент на полезную модель № 128878 Российская Федерация, МПК: C07K1/12, B01J14/00. Устройство для гидролиза животного белка в составе пищевых продуктов / Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., **Вострикова Н.Л**.; заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова РАСХН.- № 2012154562/04; заявл. 17.12.2012; опубл.10.06.2013, Бюл. № 16.

55. Патент на изобретение № 2517628 Российская Федерация, G01N33/02, G01N1/18, C07K7/08 Способ определения природных аминокислот в составе белков пищевых продуктов / Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., **Вострикова Н.Л**.; заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова РАСХН.- № 2012155966/15; заявл. 24.12.2012; опубл. 27.05.2014.

56. Патент на полезную модель № 176889 Российская Федерация МПК: C12M 1/02; C12P 21/06. Устройство для гидролиза водных растворов биополимеров / Иванкин А.Н., **Вострикова Н.Л**.; Лисицын А.Б., Куликовский А.В.; заявитель и патентообладатель Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова.- № 2017138672; заявл. 07.11.2017; опубл. 01.02.2018, Бюл. № 4.

57. Патент на изобретение № 2678090 Российская Федерация, МПК G01N 33/68, G01N 27/00. Способ подтверждения аутентичности вареных колбасных изделий / Чернуха И.М., **Вострикова Н.Л**., Ковалева М.А., Ковалев Л.И.; заявитель и патентообладатель Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова.- № 201811964/28; заявл. 28.05.2018; опубл. 23.01.2019, Бюл. № 3.