

ПРИМЕНЕНИЕ ИНСТРУМЕНТОВ ПРОТЕОМИКИ НА ПРИМЕРЕ ИЗУЧЕНИЯ АВТОЛИТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ СВИНИНЫ

Чернуха И.М., Ахремко А.Г.*

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Ключевые слова: автолиз, свинина, протеомика, мышечный белок, двумерный электрофорез

Аннотация

При помощи электрофоретических методов с дальнейшей масс-спектрометрической идентификацией было обнаружено 8 белковых веществ, претерпевающие изменения в ходе автолиза. Выявленные белковые вещества имеют различное происхождение: структурные белки (фрагменты тропоминов Т и легкие цепи миозина), а также метаболические белки (креатинкиназа, пируваткиназа и альфа-енолаза). Наиболее выражено проходила декомпозиция фракций тропомина Т быстрых скелетных мышц в 28,0 кДа, 27 кДа и 26,5 кДа.

Идентификация конститутивных белков и выявление продуктов посмертной деградации белковых молекул, делают их хорошими кандидатами маркеров качества мяса, а дальнейшие исследования этих конкретных фрагментов приведут к лучшему пониманию протеолитических активностей, участвующих в посмертном превращении мышц в мясо.

Original scientific paper

APPLICATION OF PROTEOMIC TOOLS: THE AUTOLYTIC CHANGES OF PORK MUSCULAR TISSUE

Irina M. Chernukha, Anastasiya G. Akhremko*

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

Key words: autolysis, pork, proteomics, muscle protein, two-dimensional electrophoresis

Abstract

Eight protein substances that undergo changes during autolysis were found using the electrophoretic methods with the following mass spectrometric identification. The revealed protein substances have different origin: structural proteins (fragments of troponin T and myosin light chains), and metabolic proteins (creatine kinase, pyruvate kinase and alpha-enolase). The decomposition of the fractions of fast skeletal muscle troponin T in 28.0 kDa, 27 kDa and 26.5 kDa was most pronounced.

Identification of constitutive proteins and detection of the products of post — mortem degradation of protein molecules make them suitable candidates for meat quality markers and the following study of these specific fragments will lead to better understanding of the proteolytic activities that take part in the post mortem muscle transformation into meat.

Введение

Многие факторы влияют на качество мяса, в том числе, содержание животных, их рацион питания, уход, а также процесс проведения убоя, разделки и обработки туши. До недавнего времени уделялось мало внимания изучению молекулярных или биологических аспектов качества мяса. Сейчас многие новые возможности открывают методы геномики, протеомики и других «омических» подходов. В сельском хозяйстве протеомика все больше приобретает значение для научных исследований. Основным инструментом протеомики является двумерный электрофорез (2ДЭФ, 2DE).

2ДЭФ представляет собой электрофоретический метод, который позволяет проводить параллельное разделение и анализ 500–2000 отдельных белковых молекул, экстрагированных из сложных образцов. В 2DE-анализе формируются «пятнистые» структуры,

где каждое отдельное пятно представляет собой индивидуальный белок, который мигрирует к своим конкретным координатам в соответствии с его удельной молекулярной массой и зарядом. Интенсивность пятна указывает, насколько клетка произвела этот фактический белок.

В течение последних двух десятилетий 2DE-карты многих видов и тканей были опубликованы [1,2], включая карты свиней [3,4], крупного рогатого скота [5] и курицы [6]. Некоторые из этих карт были использованы для поиска молекулярных маркеров для качества мяса, на сегодняшний день подобные работы сохранили свою актуальность в пищевой отрасли.

Целью работы являлось обоснование перспективности применения протеомики и обсуждение ее использования в мясной науке на примере изучения автолитических превращений в мышцах свиньи.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Чернуха И.М., Ахремко А.Г. Применение инструментов протеомики на примере изучения автолитических изменений мышечной ткани свиньи. Теория и практика переработки мяса. 2018; 3(4): 32–37. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-4-32-37

FOR CITATION: Chernukha I.M., Akhremko A.G. Application of proteomic tools: the autolytic changes of pork muscular tissue. Theory and practice of meat processing. 2018; 3(4): 32–37. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-4-32-37

Материалы и методы

Объектом исследования являлась *M. longissimus dorsi* свинины, отобранная на мясоперерабатывающем предприятии г. Ростов-на-Дону. Образцы хранили при температуре 2 ± 2 °С в условиях промышленного холодильника в течение 120 ч. Пробы на исследования были отобраны через 24, 72 и 120 ч.

Анализ фракционного состава белков исследуемых образцов проводили методом одномерного электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в камере «VE-10» (Helicon, США). В качестве стандарта для электрофореза использовали маркер фирмы «Thermo», США, представляющий собой смесь 11 рекомбинантных белков (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 и 5 кДа). Окрашивание проводили с использованием красителя Кумасси G-250.

В качестве основной протеомной технологии применяли двумерный электрофорез (ДЭФ) по О'Фарреллу с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE), детекцию белков проводили окрашиванием Кумасси R-250. Для проведения компьютерной денситометрии использовали двумерные электрофореграммы, находившиеся во влажном состоянии. Их полные цифровые изображения и/или изображения отдельных фрагментов получали с использованием сканера Bio-5000 plus (Serva, Германия).

Идентификацию белковых фракций осуществляли после трипсинолиза методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI-времетраплетном масс-спектрометре Ultraflex («Bruker», Германия) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да с калибровкой их по известным пикам автолиза трипсина. Анализ полученных масс-спектров триптических пептидов выполняли с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США), с точностью определения массы МН+ равной 0,01%, осуществляя поиск по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) [7].

Результаты и обсуждение

Начало протеомики было заложено благодаря одномерному (1D) электрофорезу, предложенный в 1970 году Уильрихом Лэммли [8]. В настоящее время данный метод используется для оценки молекулярно-массового распределения белков в изучаемом образце. На начальном этапе исследований полученные результаты помогают прогнозировать количественное и качественное распределение структурных и тканеспецифичных белковых молекул или оценить влияние различных процессов, например автолитических (Рис. 1).

На 1D электрофореграмме желтым цветом отмечены зоны, в которых по изменению интенсивности окраски белковых полос можно прогнозировать их количество. Однако серьезным недостатком 1D-электрофореза является то, что анализ ограничивается только

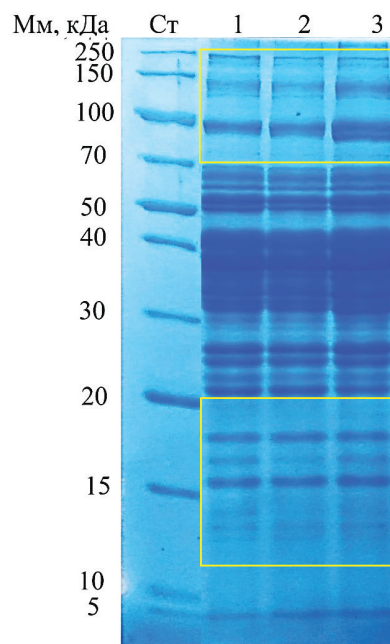


Рис. 1. Электрофореграмма белков мышечной ткани *Sus scrofa*, претерпевающей автолитические изменения. Окрашивание Кумасси G-250. Условные обозначения: Ст — маркеры молекулярной массы; 1–1 сутки автолиза; 2–3 сутки автолиза; 3–5 сутки автолиза

приблизительным определением молекулярной массы, также в одной белковой полосе может содержаться несколько молекул белка с одной молекулярной массой.

Повысить эффективность и разрешающую способность удалось Патрику О'Фарреллу. В 1975 году им был предложен метод 2DE [9], при осуществлении которого белки разделяют по двум различным физико-химическим параметрам [10,11].

Поскольку более 20% мышечной массы (или мяса) состоит из белков, очевидно наличие взаимосвязи между мышечными белками и качеством мяса. Было выявлено, что при автолитических превращениях мышцы свинины претерпевают изменения такие белки (Рис. 2) как пируваткиназа (1), альфа-енолаза (2), креатинкиназа (3), тропонины Т (4,5,6), легкие цепи миозина (7,8).

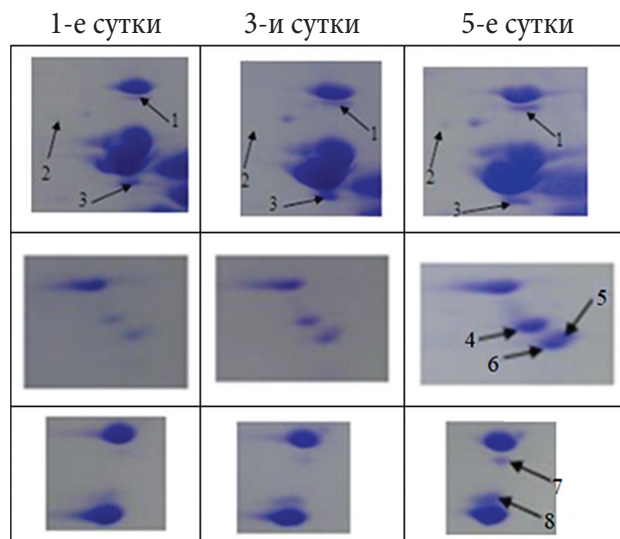


Рис. 2. Фрагменты 2D-электрофореграмм с выявленными признаками автолитических изменений в образцах свинины

Таблица 1. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS / MS) белковых фракций, проявляющих изменения на 2ДЕ белков *M. longissimus dorsi Sus scrofa* в процессе автолиза (номера белков соответствуют Рис. 2).

| № | Наименование белка; некоторые синонимы, (символ гена) | Номера в Protein NCBI | Мм/рI* (эксп.) ** | Мм/рI (расчет.) ** |
|---|---|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 1 | pyruvate kinase PKM isoform X6 (PKM2) | 545841009 | 58,0/6,80 | 58,0/7,62 |
| 2 | alpha-enolase (ATP5A1) | 927145216 | 52,0/5,80 | 47,0/6,44 |
| 3 | creatine kinase M-type (CKM) | 194018722 | 41,0/6,60 | 43,0/6,61 |
| 4 | troponin T fast skeletal muscle type (TNNT3) | 46389777 | 28,0/7,90 | 29,8/7,72 |
| 5 | troponin T, fast skeletal muscle (TNTF) | 55741811 | 27,0/8,00 | 32,2/6,05 |
| 6 | troponin T fast skeletal muscle type (TNNT3) | 46389785 | 26,5/7,95 | 30,7/8,69 |
| 7 | MLC1f (MYL1) | 117660874 | 20,0/4,80 | 21,0/4,90 |
| 8 | myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (HUMMLC2B) | 54607195 | 15,0/4,65 | 19,0/4,90 |

* Мм — молекулярная масса, рI — изоэлектрическая точка

** Мм/рI (эксп.) — полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ, а Мм/рI (расчет.) — расчетные оценки, сделанные из данных об аминокислотной последовательности с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других постсинтетических модификаций с помощью программы ExPASy Compute pI/Mw tool

Идентифицированные с помощью масс-спектрометрии белки приведены в Табл. 1. Выявленные пятна имеют различное происхождение: структурные белки, а именно тропонины Т и легкие цепи миозина, а также метаболические белки, такие как креатинкиназа, пируваткиназа и альфа-енолаза. Три пятна были идентифицированы как фрагменты тропонина Т в 28,0 кДа, 27 кДа и 26,5 кДа и как показано на рисунке 2, уменьшались по интенсивности, тогда как полноразмерный тропонин Т (43 кДа) не обнаруживался. Повсеместная деградация тропонина Т хорошо известна, и считается, что она связана с нежностью мяса [12].

Изменение интенсивности пятен легких цепей миозина (МЛЦ), предположительно влияет на цвет мяса и его нежность, так как МЛЦ регулируют активацию миофиламента посредством фосфорилирования с помощью связывания ионов кальция.

К третьим суткам увеличивается интенсивность пятна, соответствующего креатинкиназе, а к пятым суткам снова уменьшается. Это связано с трансдукцией энергии в тканях с большими, колеблющимися энергетическими потребностями, такими как скелетная мышца.

Также отмечено нарастание большого аллостерического фрагмента пируваткиназы, который регулирует гликолиз посредством связывания субстрата, фосфоенолпирувата и одной или нескольких активных молекул. Увеличение концентрации пируваткиназы говорит об изменении его активности в результате нековалентного присоединения к её аллостерическому центру специфического метаболита (аминокислоты, нуклеотида и др.).

Значительное увеличение интенсивности альфа-енолазы, как участника биосинтеза аминокислот,

впоследствии может спровоцировать увеличение их количества в мышечной ткани в процессе автолитических изменений.

Таким образом, это исследование дает лучшее понимание изменения протеома во время посмертных превращений в мышцах свиньи. Претерпевали модификацию структурные белки и ферменты, связанные с гликолитическим путем и энергетическим обменом. Дальнейшие исследования посттрансляционных модификаций родственных белков и изменения уровня метаболитов еще предстоит изучить.

Выводы

Двумерный электрофорез является эффективным методом идентификации белков мяса. Протеомными методами изучено 8 белковых молекул, которые были подвержены изменениям в результате посмертных автолитических превращений. Показано, что основным признаком автолитических процессов является появление фрагментов тропонина Т быстрых скелетных мышц, вследствие последовательного уменьшения фрагментов пептидов C- и N- концевой части молекулы.

Выявлено, что метаболические ферменты деградируют в процессе автолиза. Роль этих ферментов в посмертном метаболизме мяса еще не до конца изучена, и результаты проведенного исследования могут помочь сосредоточиться на данных аспектах посмертных изменений, и определить взаимосвязь с качеством мяса.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16–16–10073).

Introduction

Many factors affect meat quality including keeping animals, their diet, handling and the processes of slaughter, carcass cutting and processing. Until recently, little attention was paid to the molecular or biological aspects of meat

quality. Nowadays, the methods of genomics, proteomics and other «omic» approaches open multiple new possibilities. In agriculture, proteomics is becoming more and more important for scientific research. The main tool of proteomics is two-dimensional electrophoresis (2DE).

2DE is an electrophoretic method, which allows performing parallel separation and analysis of 500–2000 individual protein molecules, extracted from complex samples. In 2DE analysis the «spotty» structures are formed, where each individual spot represents an individual protein, which migrates to its own specific coordinates according to its specific molecular weight and charge. The spot intensity shows how much of this actual protein was produced by a cell.

During last two decades, 2DE maps of many species and tissues were published [1,2], including maps of pigs [3,4], cattle [5] and chicken [6]. Several of these maps were used for a search of molecular markers for meat quality; today, these works remain topical in the food industry.

The aim of this work was substantiation of prospectivity of the proteomics use and discussion of its application in the meat industry by the example of the study of the autolytic transformations in the pork muscles.

Materials and methods

The object of the research was pork *M. longissimus dorsi*, obtained from the meat processing plant in the city of Rostov-on-Don. The samples were stored at a temperature of 2 ± 2 °C in the conditions of a commercial refrigerator for 120 hours. The samples for analysis were taken after 24, 72 and 120 hours.

Analysis of the protein fractional composition of the samples under investigation was carried out by one-dimensional electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate in a chamber «VE-10» (Helicon, USA). As a standard for electrophoresis, we used the marker of the «Thermo» company (USA), which is a mixture of 11 recombinant proteins (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 and 5 kDa). Staining was carried out using Coomassie G-250.

As the main proteomic technology, two-dimensional electrophoresis (2DE) by O'Farrell with isoelectric focusing in the ampholine gradient (IEF-PAGE) was used; protein detection was carried out by staining with Coomassie R-250. To perform the computer densitometry, two-dimensional electropherograms being in a wet state were used. Their complete digital images and/or images of individual fragments were obtained using a Bio-5000 Plus scanner (Serva, Germany).

Identification of the protein fractions was carried out after trypsinolysis by mass spectrometry MALDI-TOF MS and MS/MS using Ultraflex MALDI TOF mass spectrometer (Bruker, Germany) with the UV laser (336 nm) in the mode of positive ions in the mass range of 500–8000 Da with their calibration by the known peaks of trypsin autolysis. Analysis of the obtained mass spectra of the tryptic peptides was performed using the Mascot program, Peptide Fingerprint option (Matrix Science, USA), with the accuracy of MH⁺ mass detection equal to 0.01%, searching in the databases of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) [7].

Results and discussion

Proteomics traces back to one-dimensional (1D) electrophoresis proposed by Ulrich K. Laemmli in 1970 [8]. At present, this method is used to assess the protein molecular weight distribution in the studied sample. At the early stage of investigations, the obtained results help predict quantitative and qualitative distribution of structural and tissue specific protein molecules and assess an impact of different processes, for example, autolysis (Figure 1).

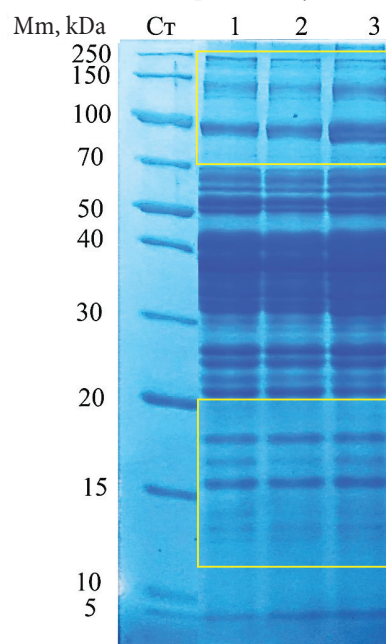


Figure 1. Electropherograms of proteins of *Sus scrofa* muscle tissue undergoing autolytic changes. Staining with Coomassie G-250. Cr — markers of molecular weight; 1–1 day of autolysis; 2–3 days of autolysis; 3–5 days of autolysis

On the 1D electropherograms, the zones, in which a change in the color intensity of the protein bands can be used to predict their quantity, are marked with the yellow color. However, a serious disadvantage of 1D electrophoresis is the fact that analysis is limited only to the approximate detection of the molecular weight and one protein band can contain several protein molecules with the same molecular weight.

Patrick O'Farrell managed to increase the effectiveness and resolving power. In 1975, he proposed the 2DE method [9], in which proteins are separated by two different physico-chemical parameters [10,11].

As more than 20% of muscle mass (or meat) is composed of proteins, the presence of interrelation between muscle proteins and meat quality is evident. It was found that proteins (Figure 2) such as pyruvate kinase (1), alpha-enolase (2), creatine kinase (3), troponins T (4,5,6) and myosin light chains (7,8) undergo changes upon the autolytic transformations of pork muscles.

Proteins identified by mass spectrometry are presented in table 1. The revealed spots have different origin: structural proteins, namely, troponins T and myosin light chains, as well as metabolic proteins such as creatine kinase, pyruvate kinase and alpha-enolase. Three

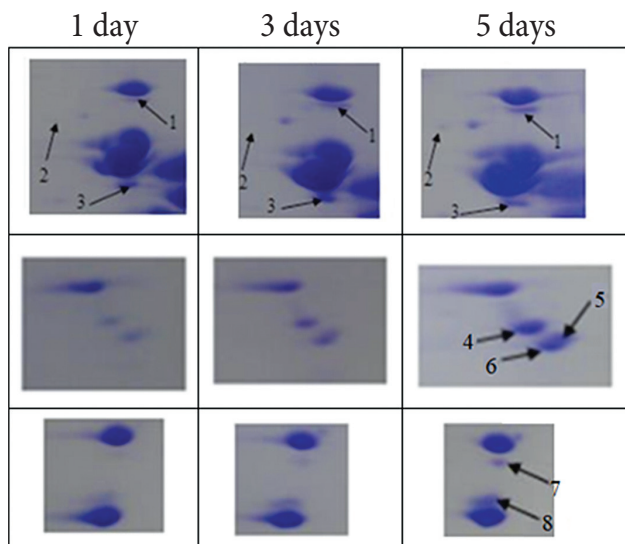


Figure 2. 2DE fragments with revealed signs of the autolytic changes in the studied pork samples

spots were identified as the fragments of troponin T in 28.0 kDa, 27 kDa and 26.5 kDa, and, as shown in Fig. 2, they decreased in intensity, while full-size troponin T (43 kDa) was not found. Extensive degradation of troponin T is well-known and it is believed that it is linked with meat tenderness [12].

A change in the spot intensity of myosin light chains (MLCs) presumably affects the meat color and its tenderness as MLCs regulate activation of the myofilament by phosphorylation by calcium ion binding.

The intensity of the spot that corresponded to creatine kinase increased by the 3rd day, and decreased again by the 5th day. This is associated with energy transduction in tissues with high variable energy requirements such as skeletal muscle.

In addition, an increase in the large allosteric fragment of pyruvate kinase, which regulates glycolysis by linking the substrate, phosphoenolpyruvate, and one or

several active molecules was observed. An increase in the concentration of pyruvate kinase suggests a change in its activity as a result of non-covalent attachment of a specific metabolite (amino acid, nucleotide and others) to its allosteric center.

A significant increase in the intensity of alpha-enolase as a participant of biosynthesis of amino acids can afterwards provoke an increase in their quantity in the muscle tissue in the process of autolytic changes.

Therefore, this study provides a better understanding of proteome changes during postmortem transformations in porcine muscles. The structural proteins and enzymes linked with the glycolytic pathway and energy metabolism were modified. The further research of post-translational modifications of related proteins and changes in the level of metabolites is needed.

Conclusions

Two-dimensional electrophoresis is an effective method for meat protein identification. Eight protein substances that undergo changes during most mortem autolytic transformations were studied by the proteomic methods. It was shown that the main sign of the autolytic processes was an appearance of the fragments of fast skeletal muscle troponin T due to a continuous decrease in the fragments of peptides of C- and N- terminal parts of molecules.

It was found that metabolic enzymes degrade during autolysis. The role of these enzymes in the meat post-mortem metabolism has not been completely elucidated, and the results of the performed study can help focus on these aspects of post-mortem changes and reveal their relationship with meat quality.

Acknowledgements

The study was funded by the grant of the Russian Scientific Foundation (Project No. 16-16-10073).

Table 1. Results of the mass-spectrometric identification (MALDI-TOF MS and MS / MS) of protein fractions showing changes in 2DE of proteins from *M. longissimus dorsi* of *Sus scrofa* during autolysis (numbers of proteins correspond to Figure 2)

| No. | Proteins; several synonyms, (gene symbol) | Numbers in Protein NCBI | Mm/pI (exp.)** | Mm/pI (calc.)** |
|-----|---|-------------------------|----------------|-----------------|
| 1 | pyruvate kinase PKM isoform X6 (PKM2) | 545841009 | 58.0/6.80 | 58.0/7.62 |
| 2 | alpha-enolase (ATP5A1) | 927145216 | 52.0/5.80 | 47.0/6.44 |
| 3 | creatine kinase M-type (CKM) | 194018722 | 41.0/6.60 | 43.0/6.61 |
| 4 | troponin T fast skeletal muscle type (TNNT3) | 46389777 | 28.0/7.90 | 29.8/7.72 |
| 5 | troponin T. fast skeletal muscle (TNNT3) | 55741811 | 27.0/8.00 | 32.2/6.05 |
| 6 | troponin T fast skeletal muscle type (TNNT3) | 46389785 | 26.5/7.95 | 30.7/8.69 |
| 7 | MLC1f (MYL1) | 117660874 | 20.0/4.80 | 21.0/4.90 |
| 8 | myosin regulatory light chain 2. skeletal muscle isoform (HUMMLC2B) | 54607195 | 15.0/4.65 | 19.0/4.90 |

* Mm — molecular weight, pI — isoelectric point

** Mm/pI (exp.) — scores obtained by the results of the electrophoretic mobility on DE, Mm/pI (calc.) — estimates made on the basis of the data on the amino acid sequence with consideration for signal peptide removal, but without regard for other post-synthetic modifications using the program ExPASy Compute pI/Mw tool

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. ExPASy. SIB Bioinformatics Resource Portal [Электронный ресурс: <http://www.expasy.org/proteomics/> Дата обращения 30.10.2018 г.]
2. База данных «Протеомика мышечных органов» [Электронный ресурс <http://mp.inbi.ras.ru> Дата обращения 30.10.2018 г.]
3. Lametsch, R., Roepstorff, P., Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during postmortem storage of pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5508–5512.
4. Morzel, M., Chambon, C., Hamelin, M., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Monin, G. (2004). Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Science*, 67(4), 689–696.
5. Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. (2004). Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4(6), 1811–1824.
6. Doherty, M.K., McLean, L., Hayter, J.R., Pratt, J.M., Robertson, D.H.L., El-Shafei, A., Gaskell, S.J., Beynon, R.J. (2004). The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics*, 4(7), 2082–2093.
7. Ковалев, Л.И., Шишкин, С.С., Ковалева, М.А., Иванов, А.В., Вострикова, Н.Л., Чернуха, И.М. (2013). Протеомное изучение белков в образцах свинины и выработанных из нее мясных продуктах. *Все о мясе*, 3, 32–34.
8. Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
9. O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007–4021.
10. Chernukha, I.M., Fedulova, L.V., Akhremko, A.G., Kotenkova, E.A. (2017). A comparative study of *Sus scrofa m. Longissimus dorsi* with different changes in quality. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 11(1), 398–402.
11. Замаратская, Г., Ли, Ш. (2017). Протеомика в науке о мясе-современное состояние и перспективы. *Теория и практика переработки мяса*, 2(1), 18–26.
12. Muroya, S., Ohnishi-Kameyama, M., Oe, M., Nakajima, I., Chikuni, K. (2007). Postmortem changes in bovine troponin T isoforms on two-dimensional electrophoretic gel analyzed using mass spectrometry and western blotting: The limited fragmentation into basic polypeptides. *Meat Science*, 75(3), 506–14

REFERENCES

1. ExPASy. SIB Bioinformatics Resource Portal [Electronic resource URL: <http://www.expasy.org/proteomics/> Access data: 30.10.2018 г.]
2. Database «Proteomics of the muscular organs» [Electronic resource URL: <http://mp.inbi.ras.ru> Access data: 30.10.2018 г.]
3. Lametsch, R., Roepstorff, P., Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during postmortem storage of pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5508–5512.
4. Morzel, M., Chambon, C., Hamelin, M., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Monin, G. (2004). Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Science*, 67(4), 689–696.
5. Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. (2004). Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4(6), 1811–1824.
6. Doherty, M.K., McLean, L., Hayter, J.R., Pratt, J.M., Robertson, D.H.L., El-Shafei, A., Gaskell, S.J., Beynon, R.J. (2004). The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics*, 4(7), 2082–2093.
7. Kovalyov, L.I., Shishkin, S.S., Kovalyov, M.A., Ivanov, A.V., Vostrikova, N.L., Chernukha, I.M. (2013). Proteomic research proteins in a sample of pork meat products. *Vsyo o myase*, 3, 32–34. (In Russian)
8. Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
9. O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007–4021.
10. Chernukha, I.M., Fedulova, L.V., Akhremko, A.G., Kotenkova, E.A. (2017). A comparative study of *Sus scrofa m. Longissimus dorsi* with different changes in quality. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 11(1), 398–402.
11. Zamaratskaia, G., Li, S. (2017). Proteomics in meat science-current status and future perspective. *Theory and practice of meat processing*, 2(1), 18–26. (In Russian)
12. Muroya, S., Ohnishi-Kameyama, M., Oe, M., Nakajima, I., Chikuni, K. (2007). Postmortem changes in bovine troponin T isoforms on two-dimensional electrophoretic gel analyzed using mass spectrometry and western blotting: The limited fragmentation into basic polypeptides. *Meat Science*, 75(3), 506–14

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Чернуха Ирина Михайловна — доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ведущий научный сотрудник, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-63-21
E-mail: imcher@inbox.ru

Ахремко Анастасия Геннадьевна — младший научный сотрудник, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-92-11
E-mail: a.ahremko@fnpcs.ru
*автор для переписки

Критерии авторства

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 08.11.2018

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Irina M. Chernukha — doctor of technical sciences, professor, corresponding member to the Russian Academy of Sciences, leading research scientist, Experimental clinic-laboratory «Biologically active substances of an animal origin», V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel: +7-495-676-63-21
E-mail: imcher@inbox.ru

Anastasiya G. Akhremko — research assistant, Experimental clinic-laboratory «Biologically active substances of an animal origin», V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-92-11
E-mail: a.ahremko@fnpcs.ru
*corresponding author

Contribution

Authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 08.11.2018