

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АВТОЛИТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОМА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ СВИНИНЫ И ГОВЯДИНЫ

Чернуха И.М., Ахремко А.Г.\*

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

**Ключевые слова:** автолиз, свинина, говядина, протеомика, электрофорез, белок

## Аннотация

В работе представлены исследования по изучению автолитических превращений в мышцах свинины и говядины протеомными методами. Изменения белковых фракций анализировали одномерным и двумерным электрофорезом с дальнейшей идентификацией масс-спектрометрическими методами, были обнаружены изменения в мышечных белках, с течением автолитических процессов. Так, интенсивность белковых пятен пируваткиназы, легких цепей миозина и аденилаткиназы увеличивалась в процессе автолиза. Отмечается появление фрагментов легких цепей миозина. Также была изучена активность эндогенных ферментов, таких как кальпаин 3 и катепсин D в ходе автолиза. В первые 24 часа после убоя животного активность данных ферментов достигала максимального значения, затем снижалась. Результаты проведенных исследований подтвердили, что у свинины и говядины различная скорость протекания автолиза, но сходные протеомные изменения.

Original scientific paper

# COMPARATIVE STUDY OF AUTOLYTIC CHANGES IN PORK AND BEEF MUSCLE TISSUE PROTEOME

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, beef, proteomics, electrophoresis, protein

## Abstract

The paper presents the studies on the autolytic transformations in pork and beef samples by proteomic methods. The changes in the protein fractions were analyzed by one-dimensional and two-dimensional electrophoresis with the following identification by mass-spectrometric methods. The changes in muscle proteins in the course of autolytic processes were found. For example, the intensity of the protein spots of pyruvate kinase, myosin light chains and adenylate kinase increased during autolysis. The fragments of myosin light chains appeared. The activity of the endogenous enzymes, such as calpain 3 and cathepsin D in the course autolysis was also studied. During the first 24 hours after animal slaughter, the activity of these enzymes reached the maximum level and then decreased. The results of the performed investigations confirmed that pork and beef have different rate of autolysis but similar proteomic changes.

## Введение

Белки являются важным нутриентом в рационе человека. В качестве пищевых ингредиентов они в основном поступают из продуктов животного и растительного происхождения. Протеомика имеет в своем арсенале такие методы, которые способны охарактеризовать белковый состав продуктов, какие белки присутствуют в каждом типе ткани, а также позволяет исследовать их различия в белковой композиции. Кроме того, протеомные методы позволяют отслеживать изменения протеома до и после убоя, а также оценивать влияние последующих процессов, таких как автолиз. В дополнение к посттрансляционным модификациям, которые происходят *in vivo*, пищевые белки подвергаются широкому спектру послеубойных

процессов. Эти модификации включают окисление боковой цепи, образование поперечных связей и расщепление белковых молекул и критически влияют на такие основные свойства мяса, как срок хранения, пищевая ценность, усвояемость и последствия для здоровья [1].

За последние пять лет в области протеомики мяса наблюдался устойчивый рост научного интереса. Было проведено большое количество исследований с появлением нескольких отдельных категорий. Открытие белков-маркеров для различных атрибутов качества мяса — еще одна важная область. Процессы посмертного превращения мышц привлекают особый интерес и представляет собой значительную серию событий, связанных с модификацией и разрушением белка [2].

**ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:** Чернуха И.М., Ахремко А.Г. Сравнительное изучение автолитических изменений протеома мышечной ткани свинины и говядины. *Теория и практика переработки мяса*. 2018; 3(3): 56–63. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-56-63

**FOR CITATION:** Chernukha I.M., Akhremko A.G. Comparative study of autolytic changes in pork and beef muscle tissue proteome. *Theory and practice of meat processing*. 2018;3(3): 56–63. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-56-63

Во время процесса превращения мышц в мясо происходят существенные биохимические / биофизические изменения в мышцах, и эти изменения непосредственно влияют на характеристики качества мяса [2,3]. Поэтому целью данного исследования было изучение автолитических процессов в свинине и говядине, а также их сравнение с помощью протеомных методов.

### Объекты и методы

Объектами исследования являлись: 1) вырезка говяжья, приобретенная в магазине торговой марки «Халяль». Мясо поставлено в магазин из Владимирской области. Время от убоя до момента начала эксперимента составило 15 ч, что соответствует стадии посмертного окоченения. Процесс автолиза проходил при температуре  $4 \pm 2$  °C в течение 12 суток в вакуумном контейнере. 2) *M. longissimus dorsi* свинины, отобранная на мясоперерабатывающем предприятии г. Ростов-на-Дону. Образцы хранили при температуре  $2 \pm 2$  °C в условиях промышленного холодильника в течение 120 ч. Пробы на исследования были отобраны через 24 ч, 72 ч и 120 ч.

Определение водосвязывающей способности проводилось по методу Грау-Хамма (метод прессования). Влажность в мясном сырье определялась методом высушивания навески пробы с песком до постоянной массы при температуре  $(103 \pm 2)$  °C в соответствии с ГОСТ Р 51479–99 (ИСО 1442–97) «Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли влаги».

Измерение pH проводилось потенциометрическим методом на pH-ионметре «Эксперт» в соответствии с ГОСТ Р 51478–99 (ИСО 2917–74) «Контрольный метод определения концентрации водородных ионов (pH)».

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 на ДЭФ проводили окрашиванием Кумасси R-250 и азотнокислым серебром. Для проведения компьютерной денситометрии использовали двумерные электрофореграммы, находившиеся во влажном состоянии. Их полные цифровые изображения и/или изображения отдельных фрагментов получали с помощью сканирования на сканере Epson в режиме 300 dpi, 48 bit Color [4,5].

Определение количественного содержания кальпаина 3 и катепсина D проводили с помощью химико-иммунологического анализа, методом ELISA на иммуноферментном анализаторе ImmunoChem (HTI, США) с использованием коммерческих наборов (Cloud-Clone Corp., Китай). Пробоподготовку осуществляли следующим способом: мышечную ткань гомогенизировали в ступке с добавлением фосфатно-солевого буфера (pH 7,41X), количественно переносили в эппендорф, центрифугировали при 5000g в течение 5 мин, отбিরали супернатант и проводили исследование.

### Результаты и обсуждение

Биохимические механизмы, приводящие к изменениям в мышечной ткани, зависят от pH. В образцах свинины отмечено изменение pH через 24 ч, 72 ч и 120 ч, при этом водосвязывающая способность постепенно снижалась с 92,05 % до 87,66 % к 120 ч автолиза.

В случае автолиза мяса говядины значение pH с 5,65 сместилось в кислую сторону к 6 суткам до минимального значения 5,15, а затем стало расти в щелочную, и достигло 6,04 на 9 сутки. Показатель водосвязывающей способности снизился с 67,29 % до 66,83 % к 6 суткам автолиза, затем начал расти.

Изучение влияния автолитических процессов на изменения белкового профиля мяса свинины методом одномерного электрофореза показало, что фракции свыше 100 кДа увеличиваются в интенсивности окраски полос к 120 ч автолиза, но количество фракций стабильно. Интенсивность фракций с молекулярной массой в области 90–100 кДа увеличивается от первых суток к пятым. В диапазоне от 50 кДа до 70 кДа интенсивность полос неизменна, но на пятые сутки появляются две минорные полосы в области 80 кДа. Отмечено увеличение интенсивности белковых полос с молекулярной массой 30–32 кДа, а также под действием эндогенных ферментов происходит деградация белков с молекулярной массой ниже 15 кДа.

Отмечены изменения соотношения мажорных и минорных белковых фракций.

При анализе одномерных электрофореграмм белкового профиля скелетных мышц *Bos Taurus* показано увеличение концентраций мажорных и минорных белковых фракций ко вторым суткам, а затем заметное уменьшение количества фракций к девятым суткам, так на первые сутки наблюдалось 32 белковые полосы, а на девятые сутки 23 полосы. Предположительно, это связано с изменением величины pH, которая смещается в щелочную сторону на 9 сутки (с 5,65 до 6,04), такое значение pH близко к оптимуму активности протеиназ — кальпаинов, под действием которых происходит деградация белковых молекул [6,7].

На Рис. 1 и Рис. 2 представлены фрагменты двумерных электрофореграмм (ДЭ) белков свинины и говядины, соответственно, в которых наиболее выражена деформация белковых фракций.

Наименование белка	24 ч	72 ч	120 ч
Пируваткиназа			
Легкие цепи миозина			
Аденилаткиназа			

Рис. 1. Фрагменты ДЭ с выявленными признаками автолитических изменений в исследованных образцах свинины на 1, 3 и 5 сутки автолиза

Наименование белка	48 ч	96 ч	168 ч
Пируваткиназа			
Легкие цепи миозина			
Аденилаткиназа			

Рис. 2. Фрагменты ДЭ с выявленными признаками автолитических изменений в исследованных образцах говядины на 1, 5 и 9 сутки автолиза

Отмечено увеличение интенсивности от первых суток к пятым суткам эксперимента белка пируваткиназы, миозиновой легкой цепи 15 кДа, миозиновой легкой цепи 20 кДа и аденилаткиназы. Такая же тенденция изменения интенсивности пятен отмечена у образцов мяса говядины (Рис. 2). За исключением фракции пируваткиназы, которая к 9 суткам автолиза упрощается до коротких пептидов под действием эндогенных ферментов.

Для получения более детальной информации об изменениях белков был проведен двумерный электрофорез с последующей идентификацией методом масс-спектрометрии MALDI-TOF MS и MS/MS (Табл. 1).

Полученные результаты протеомных исследований позволяют заметить схожие механизмы деформации белковых фракций, но с различной скоростью, в мышцах говядины данные изменения проходят более продолжительно, чем в мышцах свинины. Это связано с тем, что мышечные волокна говядины более крупные, соответственно автолитические процессы проходят медленнее.

Известно, что автолитические изменения в мышцах *postmortem* происходят под действием ферментов протеолитических систем — кальпаинов и катепсинов, связанных с катализом непрерывного распада

главных структурных элементов мышечного волокна, в т. ч. актомиозинового комплекса. При этом экзопептидазы наиболее активны на последних стадиях расщепления белковых молекул, под действием эндопептидаз образуется много новых концевых групп, что было отмечено выше. Изучение динамики изменения катепсина D и кальпаина 3 в мышечной ткани свинины и говядины представляло, в этой связи, несомненный интерес.

Кальпаиновая система, включающая порядка восьми родственных подгрупп и «кальпаин подобные белки», является наиболее важной с точки зрения процессов созревания мяса. Под воздействием ферментов происходят изменения в структуре и свойствах белков мяса. Катепсины, локализованные преимущественно в лизосомах, высвобождаются при активации кислой реакцией среды клетки и вызывают деструкцию высокомолекулярных белков.

Эти данные коррелируют со значениями pH: катепсин D, являясь карбоксильной эндопептидазой, расщепляющей низкомолекулярные пептиды построенные из 5 и более аминокислотных остатков, белки — тропонин, тропомиозин, коннектин, проявляет максимальную активность при pH 2,8–5,0, тогда как протеогликаны — при pH 5,0–6,0.



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

Наименование белка; некоторые синонимы, (символ гена)	Номера в ProteinNCBI	S/M/C*	Мм/рI (эксп.)**	м/рI (расчет.)**
<i>Sus scrofa</i>				
pyruvate kinase PKM isoform X6 (PKM2)****(3)	545841009	242/92/82	58,0/6,80	58,0/7,62
adenylate kinase isoenzyme 1 isoform X2 (AK1)	350579686	264/32/83	21,0/6,70	21,6/8,38
MLC1f (MYL1)	117660874	278/25/86	20,0/4,80	21,0/4,90
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (HUMMLC2B) ****(2)	54607195	452/47/88	15,0/4,65	19,0/4,90
<i>Bos taurus</i>				
pyruvate kinase PKM isoform X1 (PKM)*** (1)	XP 005211367.1	78/45/72	56,0/7,10	58,0/7,62
myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform (MYL1) N-концевой фрагмент	NP 001073046.1	186/18/71	20,0/4,96	21,0/4,96
adenylate kinase isoenzyme 1 (AK1)	NP 001013600.1	188/16/65	20,5/7,15	21,6/8,40

\* S / M / C:: Score — показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides — количество совпавших пептидов; Coverage — % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

\*\* 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

\*\*\* Предсказаны по транскриптам или генам

\*\*\*\* Охарактеризованы программой Mascot по аналогии с соответствующим белком, геном или транскриптом у другого вида млекопитающих (корова, верблюд дикий); в столбце «Номера в Protein NCBI» ссылки на сведения у соответствующего животного.

\*\*\*\*\* msms — указание на подтверждающую идентификацию с помощью тандемной масс-спектрометрии, в скобках указано количество секвенированных триптических пептидов.

Полученные результаты не выявили значимого изменения кальпаина 3 в свинине, что может объясняться незначительной ролью кальпаина 3 в активации процессов биохимических превращений белков скелетных мышц свиней. Наши результаты согласуются с данными Geesink et al. [8], в опыте на мышцах-нокаутах по кальпаину 3, не выявившем различий в ходе протеолиза тканей *postmortem* по сравнению с контрольными.

## Выводы

Отмечена активность катепсина D, изменяющаяся в процессе посмертных превращений. Установлена корреляция между активностью катепсина D и из-

менениями протеома исследуемых скелетных мышц. Протеомными исследованиями было эмпирически подтверждено, что автолитические процессы как у свинины, так и у говядины происходят с разной скоростью, но по сходным механизмам: во всех образцах свинины в процессе автолиза практически идентично происходит распад высокомолекулярных белков, кроме того происходили изменения в близких группах мышечных белков, таких как пируваткиназа, миозиновые легкие цепи и аденилаткиназа.

Не выявлено достоверного изменения кальпаина 3 в течение 5 (в свинине) или 9 (говядине суток) после убоя.

## Introduction

Proteins are important nutrients in human diet. As food ingredients, they mainly come from the products of animal and plant origin. Proteomics has such methods in its arsenal that can characterize protein composition of products, determine what proteins are present in each tissue type, and study the differences in the protein composition. Moreover, the proteomic methods allow tracing changes in a proteome before and after slaughter, as well as assessing an effect of the subsequent processes such as autolysis. In addition to the post-translational modifications, which occur *in vivo*, food proteins are subjected to a broad spectrum of the postmortem processes. These modifications include side-chain oxidation, formation of cross-links and cleavage of protein molecules, and critically affect such main meat properties as shelf life, nutritional value, assimilability and consequences for health [1].

During the last five years, a stable growth of the scientific interest has been observed in the field of meat pro-

teomics. Many studies were carried out with appearance of several individual categories. Discovery of marker proteins for different meat quality attributes is another important field. The processes of muscle postmortem changes attract particular interest and represent an important series of events that are connected with protein modification and destruction [2].

In the process of muscle transformation into meat, significant biochemical/biophysical changes in muscles occur, and these changes directly influence meat quality characteristics [2,3]. Therefore, the aim of this research was to investigate the autolytic processes in pork and beef, and to compare them using the proteomic methods.

## Objects and methods

The objects of the research were: 1) beef tenderloin bought in a shop of the «Halal» brand. Meat was supplied to the shop from the Vladimirsky region. The time from slaughter to the beginning of the experiment was 15 hours,

which corresponds to rigor mortis. The process of autolysis occurred at a temperature of  $4 \pm 2$  °C for 12 days in a vacuum container. 2) pork *M. longissimus dorsi* taken from the meat processing plant in the city of Rostov-on-Don. The samples were stored at a temperature of  $2 \pm 2$  °C in the conditions of the commercial refrigerator for 120 hours. The samples for investigations were taken at 24 h, 72 h and 120 h.

The water holding capacity was measured by the Grau and Hamm method (filter paper press method). Moisture in meat raw materials was determined by the method of specimen drying with sand until the constant mass at a temperature of  $(103 \pm 2)$  °C according to GOST R51479-99 (ISO 1442-97) «Meat and meat products. Method for determination of moisture content».

pH measurement was carried out by the potentiometric method on the pH- ionometer «Expert» according to GOST R51478-99 (ISO 2917-74) «Meat and meat products. Reference method for measurement of pH».

The protein fractional composition was analyzed by one-dimensional electrophoresis in 12,5 % polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate in the chamber VE-10 (Helicon, USA). As a standard for electrophoresis, the marker of the «Thermo» company (USA) containing a mixture of 11 recombinant proteins (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 and 5 kDa) was used. Staining was performed using Coomassie G-250.

As a main proteomic technology, two-dimensional electrophoresis (2DE) by O'Farrel was used with isoelectrofocusing in the ampholine gradient (IEF-PAGE); protein detection in 2DE was carried out by staining with Coomassie R-250 and silver nitrate. 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 by scanning using an Epson scan in the mode of 300 dpi, 48 bit Color [4,5].

The calpain 3 and cathepsin D were quantified by immunochemical analysis, the ELISA method on an immunoassay analyzer ImmunoChem (HTI, USA) using commercial kits (Cloud-Clone Corp., China). Sample preparation was carried out by the following method: the muscle tissue was homogenized in a mortar with addition of the phosphate-buffered saline (pH 7.41X), quantitatively transferred to Eppendorf, centrifuged at 5000g for 5 min., supernatant was taken and an analysis was carried out.

## Results and discussion

The biochemical mechanisms leading to changes in the muscle tissue depend on pH. In the pork samples, a change in pH was noticed after 24 h, 72h and 120 h; with that, the water binding capacity gradually decreased from 92.05% to 87.66% by 120 h of autolysis.

In case of beef autolysis, the pH value of 5.65 moved towards the acid side by the 6th day up to the minimal value of 5.15, and then began to grow towards the alkaline side

and reached 6.04 by the 9th day. The water holding capacity decreased from 67.29 % to 66.83 % by the 6th day of autolysis and then began to rise.

The investigation of the effect of the autolytic processes on changes in the pork protein profile by the method of one-dimensional electrophoresis showed that the fractions higher than 100 kDa increased in the staining intensity of the bands by the 120th hour of autolysis, but the number of the fractions was stable. The intensity of the fractions with the molecular weight in the range of 90–100 kDa increased from the first day to the fifth. In the range from 50 kDa to 70 kDa the intensity of bands was constant; however, on the 5th day, two minor bands at the 80 kDa region appeared. An increase in the intensity of protein bands with a molecular weight of 30–32 kDa was noticed; in addition, degradation of proteins with a molecular weight of lower than 15 kDa took place under the effect of endogenous enzymes.

Changes in the ratio of the major and minor protein fractions were observed.

It was shown in the analysis of the one-dimensional electropherograms of the protein profile in the skeletal muscles of *Bos Taurus* that the concentrations of the major and minor protein fractions increased by the second day, and, then, the number of the fractions decreased markedly by the 9th day as 32 protein bands were observed on the 1st day and 23 bands on the 9th day. Presumably, it is associated with changes in the pH value, which is moved towards the alkaline side by the 9th day (from 5.65 to 6.04); this pH value is close to the optimal activity of proteinases — calpains, under which impact protein molecules degrade [6,7].

Figure 1 and Figure 2 present the fragments of the two-dimensional electropherograms (2DE) of pork and beef proteins, respectively, in which the deformation of the protein fractions is most pronounced.

An increase in the intensity of the protein pyruvate kinase, myosin light chain 15 kDa, myosin light chain 20 kDa and adenylate kinase was observed from the 1st day to the 5th day of the experiment. The same trend towards changes in the spot intensity was found in the beef samples (Figure 2), with exception for the pyruvate kinase fraction, which was simplified to short peptides by the 9th day of autolysis under the action of endogenous enzymes.

To obtain more detailed information about changes in proteins, two-dimensional electrophoresis was carried out with the following identification by mass spectrometry MALDI-TOF MS and MS/MS (Table 1).

The obtained results of the proteomic investigations allow observing similar mechanisms of protein fraction deformation, but with different rate; these changes occur over a longer period of time in beef muscles than in pork muscles. It is associated with the fact that beef muscle fibers are larger; consequently, the autolytic processes occur slower.

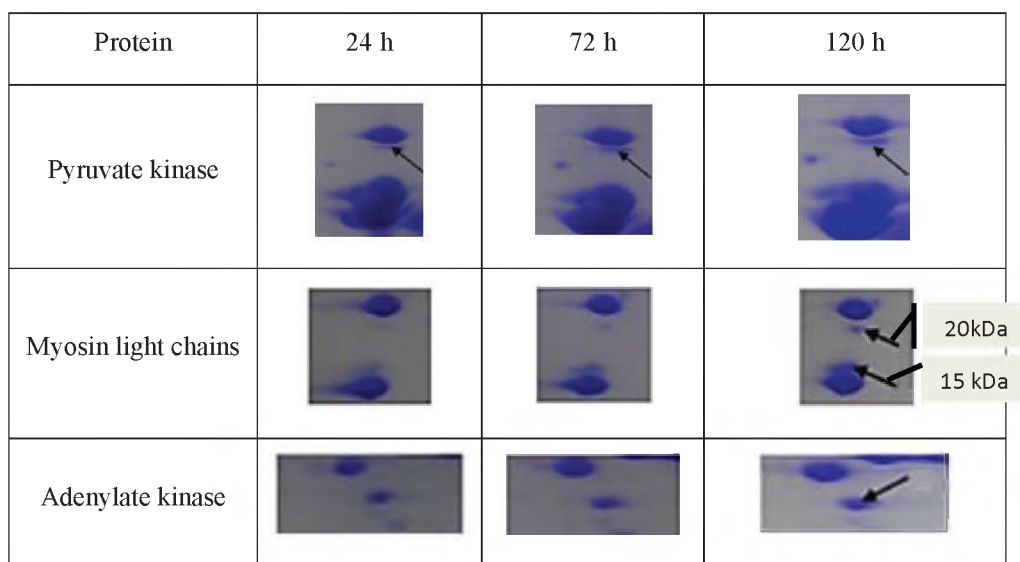


Figure 1. 2DE fragments with revealed signs of the autolytic changes in the studied pork samples by the 1st, 3rd and 5th days of autolysis

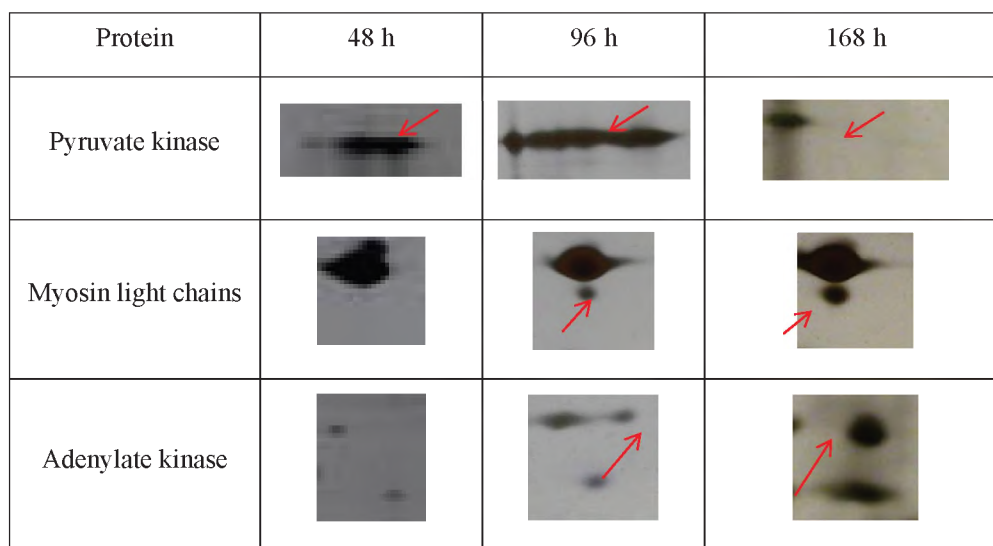


Figure 2. 2DE fragments with revealed signs of the autolytic changes in the studied beef samples by the 1st, 5th and 9th days of autolysis

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*, *Sus scrofa* and *Bos taurus* during autolysis

Proteins; several synonyms, (gene symbol)	Numbers in ProteinNCBI	S/M/C*	Mm/pI (exp.)**	Mm/pI (calc.)**
<i>Sus scrofa</i>				
pyruvate kinase PKM isoform X6 (PKM2)****(3)	545841009	242/92/82	58.0/6.80	58.0/7.62
adenylate kinase isoenzyme 1 isoform X2 (AK1)	350579686	264/32/83	21.0/6.70	21.6/8.38
MLC1f (MYL1)	117660874	278/25/86	20.0/4.80	21.0/4.90
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (HUMMLC2B) *****(2)	54607195	452/47/88	15.0/4.65	19.0/4.90
<i>Bos taurus</i>				
pyruvate kinase PKM isoform X1 (PKM)***(1)	XP 005211367.1	78/45/72	56.0/7.10	58.0/7.62
myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform (MYL1) N-terminal fragment	NP 001073046.1	186/18/71	20.0/4.96	21.0/4.96
adenylate kinase isoenzyme 1 (AK1)	NP 001013600.1	188/16/65	20.5/7.15	21.6/8.40

\* S / M / C: Score — an indicator of matches or scoring; Match peptides — the number of matched peptides; Coverage — the percentage of the complete amino acid sequence of a protein covered by identified peptides.

\*\* Mm/pI (exp.) — scores obtained by the results of the electrophoretic mobility on 2DE, 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

\*\*\* Predicted on the basis of transcripts or genes.

\*\*\*\* Characterized by the Mascot program by analogy with the corresponding protein, gene or transcript in the other mammalian species (cow, wild camel); in the column «Numbers in Protein NCBI», the references to the information for a corresponding animal are given.

\*\*\*\*\* msms — indication on the confirming identification by tandem mass-spectrometry; in parentheses, the number of sequenced tryptic peptides is indicated.



It is known that *postmortem* autolytic changes in muscles proceed under an impact of the proteolytic enzymes — calpains and cathepsins, associated with catalysis of continuous breakdown of the main structural elements of muscle fibers, including the actomyosin complex. With that, exopeptidases are most active at the last stages of protein molecule disintegration; under the action of endopeptidases many new terminal groups are formed, which was mentioned above. Therefore, a study on the dynamics of changes in cathepsin D and calpain 3 in the pork and beef muscle tissue was of undoubted interest.

The calpain system, which includes about eight related subgroups and calpain-like proteins, is the most important with respect to the meat ageing processes. Under the effect of enzymes, the structure and properties of meat proteins change. Cathepsins localized mainly in lysosomes are released upon activation by the acid reaction of the cell environment and cause destruction of high molecular weight proteins.

These data correlate with the pH values: cathepsin D being a carboxyl endopeptidase that cleaves low molecular weight peptides built from 5 and more amino acid residues, proteins — troponin, tropomyosin, connectin, exhibits the maximum activity at pH 2.8–5.0, while proteoglycans at pH 5.0–6.0.

The obtained results did not show a significant change of calpain 3 in pork, which can be explained by the minor role of calpain 3 in activation of the processes of biochemical changes in pork skeletal muscle proteins. Our results correspond to the data of Geesink et al. [8] obtained in the experiment on calpain 3 knockout mice, who did not reveal differences in the *postmortem* tissue proteolysis compared to the control.

### Conclusions

The activity of cathepsin D that changes during *postmortem* transformations was observed. The correlation between the activity of cathepsin D and changes in the proteome of the studied skeletal muscles was found. It was empirically confirmed by the proteomic investigations that autolytic processes in pork and beef proceeded with different rates but by similar mechanisms: during autolysis, the breakdown of high molecular weight proteins was practically identical in all pork samples; moreover, the changes in the related groups of muscle proteins such as pyruvate kinase, myosin light chains and adenylate kinase took place.

Significant changes in calpain 3 were not revealed during 5 days (in pork) or 9 days (in beef) after slaughter.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. 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.
2. Kim, Y.H.B., Warner, R.D., Rosenvold, K. (2014). Influence of high pre-rigor temperature and fast pH fall on muscle proteins and meat quality: a review. *Animal Production Science*, 54(4), 375–395.
3. Brewer, S., Novakofski, J. (2008). Consumer sensory evaluations of aging effects on beef quality. *Journal of Food Science*, 73(1), S78-S82.
4. Вострикова, Н.Л., Куликовский, А.В., Чернуха, И.М., Ковалев, Л.И., Савчук, С.А. (2017). Определение белков мышечной ткани методами 2D электрофореза и времяпролетной масс-спектрометрии. *Журнал аналитической химии*, 72(10), 932–943.
5. Vostrikova, N.L., Kulikovskii, A.V., Chernuha, I.M., Ivankin, A.N. (2017). Identification of Animal Muscle Proteins by 2D-Electrophoresis and Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(2), 96–105.
6. Lomiwes, D., Farouk, M.M., Wu, G., Young, O.A. (2014). The development of meat tenderness is likely to be compartmentalised by ultimate pH. *Meat Science*, 96 (1), 646–651.
7. Pomponio, L., Erbjerg, P. (2012). The effect of temperature on the activity of  $\mu$ - and  $m$ -calpain and calpastatin during *postmortem* storage of porcine longissimus muscle. *Meat science*, 91(1), 50–55.
8. Geesink, G. H., Taylor, R. G., Koohmarai M. (2005). Calpain 3/p94 is not involved in *postmortem* proteolysis. *Journal of Animal Science*, 83(7), 1646–1652.

## REFERENCES

1. 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.
2. Kim, Y.H.B., Warner, R.D., Rosenvold, K. (2014). Influence of high pre-rigor temperature and fast pH fall on muscle proteins and meat quality: a review. *Animal Production Science*, 54(4), 375–395.
3. Brewer, S., Novakofski, J. (2008). Consumer sensory evaluations of aging effects on beef quality. *Journal of Food Science*, 73(1), S78-S82.
4. Vostrikova, N.L., Kulikovskiy, A.V., Chernukha, I.M., Kovalev, L.I., Savchuk, S.A. (2017). Determination of muscle proteins by 2D methods of electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(10), 1102–1112.
5. Vostrikova, N.L., Kulikovskii, A.V., Chernuha, I.M., Ivankin, A.N. (2017). Identification of Animal Muscle Proteins by 2D-Electrophoresis and Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(2), 96–105.
6. Lomiwes, D., D., Farouk, M.M., Wu, G., Young, O.A (2014). The development of meat tenderness is likely to be compartmentalised by ultimate pH. *Meat Science*, 96 (1), 646–651.
7. Pomponio, L., Erbjerg, P. (2012). The effect of temperature on the activity of  $\mu$ - and  $m$ -calpain and calpastatin during *postmortem* storage of porcine longissimus muscle. *Meat science*, 91(1), 50–55.
8. Geesink, G. H., Taylor, R. G., Koohmarai M. (2005). Calpain 3/p94 is not involved in *postmortem* proteolysis. *Journal of Animal Science*, 83(7), 1646–1652.

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ****Принадлежность к организации**

**Чернуха Ирина Михайловна** — доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник Экспериментальной клиники-лаборатории 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 Экспериментальной клиники-лаборатории 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@fncps.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 16.07.2018**

**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. Gorbатов 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** — junior researcher, Experimental clinic-laboratory «Biologically active substances of an animal origin», V.M. Gorbатов 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@fncps.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 16.07.2018**