



ISSN 2414-438X (Print)
ISSN 2414-441X (Online)

THEORY AND PRACTICE OF MEAT PROCESSING

ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ПЕРЕРАБОТКИ МЯСА

Vol. 3 (3), 2018

Федеральное агентство научных организаций
Federal Agency of Scientific Organizations
(FANO of Russia)

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
Federal State Budgetary Scientific Institution
«V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of Russian Academy of Sciences»
(Gorbatov Research Center for Food Systems)

Теория и практика переработки мяса
Theory and Practice of Meat Processing

Учредитель и издатель: Founder and publisher:

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН

Federal State Budgetary Scientific Institution
« V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of Russian Academy of Sciences»

Главный редактор:

Лисицын Андрей Борисович, доктор технических
наук, профессор, академик РАН, научный руководитель
ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия

Заместитель главного редактора:

Чернуха Ирина Михайловна, доктор технических
наук, профессор, член-корреспондент РАН,
руководитель научного направления ФГБНУ
«Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия

Научный редактор:

Горбунова Наталия Анатольевна, кандидат
технических наук, ученый секретарь ФГБНУ
«Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия

Выпускающий редактор:

Захаров Александр Николаевич, кандидат
технических наук, старший научный сотрудник,
заведующий редакционно-издательским отделом
ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых
систем им. В.М. Горбатова» РАН,
г. Москва, Россия.

Адрес редакции и типографии:

109316, Россия, Москва, Талалихина, 26,
Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова РАН.
www.meatjournal.ru

Журнал зарегистрирован в Роскомнадзоре
Регистрационные данные:

ПИ № ФС77-71611 от 13.11.2017 года

ЭЛ № ФС77-71609 от 13.11.2017 года

Периодичность — 4 номера в год.

Издается с 2015 года.

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» 38871

Подписано в печать 24.09.18.

Тираж 1000 экз. Заказ № 124.

Типография ФНЦПС.

© ФНЦПС, 2018

ISSN 2414-438X (Print)

ISSN 2414-441X (Online)

Редакционная коллегия:

Баженова Баяна Анатольевна, доктор технических наук,
доцент, профессор кафедры «Технология мясных
и консервированных продуктов» ФГБОУ ВПО
Восточно-Сибирский университет технологии и управления,
г. Улан-Удэ, Россия

Белозеров Георгий Автономович, доктор технических наук,
член-корреспондент РАН, директор Всероссийского научно-
исследовательского института холодильной промышленности —
филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва, Россия

Горлов Иван Федорович, доктор сельскохозяйственных наук,
профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ
«Поволжский научно-исследовательский институт производства
и переработки мясомолочной продукции», г. Волгоград, Россия

Дедерер Ирина, кандидат технических наук, научный
сотрудник Института Макса Рубнера, Кульбах, ФРГ.

Джорджевич Весна, доктор, директор Института гигиены
и технологии мяса, г. Белград, Сербия

Дунченко Нина Ивановна, доктор технических наук,
профессор, заведующая кафедрой «Управление качеством
и товароведения продукции ФГБОУ ВПО «Российский
государственный аграрный университет имени
К.А. Тимирязева», Москва, Россия

Жайлаубаев Жанибек Далелович, доктор технических наук,
Академик АСХН РК, директор СФ ТОО «Казахский научно-
исследовательский институт перерабатывающей и пищевой
промышленности»,
г. Семей, Республика Казахстан

Замарацкая Гая, доктор наук, Шведский
сельскохозяйственный университет, г. Уппсала, Швеция

Кочеткова Алла Алексеевна, доктор технических
наук, профессор, руководитель лаборатории пищевых
биотехнологий и специализированных продуктов ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр питания,
биотехнологии и безопасности пищи», г. Москва, Россия

Мелешенко Алексей Викторович, кандидат экономических
наук, директор НПРДУП «Институт мясо-молочной
промышленности», г. Минск, Республика Беларусь

Мирошников Сергей Александрович, доктор биологических
наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ
«Всероссийский научно-исследовательский институт мясного
скотоводства», г. Оренбург, Россия

Римарева Любовь Вячеславовна, доктор технических
наук, профессор, Академик РАН, заслуженный деятель
науки РФ, заместитель директора Всероссийского научно-
исследовательского института пищевой биотехнологии —
филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
питания, биотехнологии и безопасности пищи»,
г. Москва, Россия

Рудь Андрей Иванович, доктор сельскохозяйственных наук,
главный научный сотрудник отдела генетики, биотехнологии
и технологии в свиноводстве ФГБНУ «Всероссийский
научно-исследовательский институт животноводства имени
академика Л.К. Эрнста», г. Подольск, Россия

Риочи Саката, профессор, университет Аджабу,
г. Сагамихара, Япония

Семенова Анастасия Артуровна, доктор технических наук,
профессор, заместитель директора ФГБНУ «Федеральный
научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН,
г. Москва, Россия

Тимошенко Николай Васильевич, доктор технических наук,
профессор, заведующий кафедрой технология хранения и
переработки животноводческой продукции Кубанского ГАУ,
г. Краснодар, Россия

Ханферьян Роман Авакович, доктор медицинских наук,
профессор, заведующий лабораторией иммунологии,
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания,
биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

Федеральное агентство
научных организаций
Federal Agency of Scientific Organizations
(FANO of Russia)

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН»
Federal State Budgetary Scientific Institution
«V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of Russian Academy of Sciences»
(Gorbatov Research Center for Food Systems)

Теория и практика переработки мяса
Theory and Practice of Meat Processing

Учредитель и издатель: Founder and publisher:
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН

Federal State Budgetary Scientific Institution
«V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of Russian Academy of Sciences»

Editor-in-Chief:

Andrey B. Lisitsyn, doctor of technical sciences, professor,
Academician of RAS, Scientific supervisor
of FGBNU «V.M. Gorbatov Federal Research Center
for Food Systems of Russian Academy of Sciences»,
Moscow, Russia

Deputy Editor-in-Chief:

Irina M. Chernukha, doctor of technical sciences,
professor, corresponding members of RAS,
head of the scientific direction FGBNU «V.M. Gorbatov
Federal Research Center for Food Systems of Russian
Academy of Sciences», Moscow, Russia

Science editor:

Natalia A. Gorbunova, candidate
of technical sciences, Academic Secretary of FGBNU
«V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of Russian Academy of Sciences», Moscow, Russia

Production editor:

Aleksandr N. Zakharov, candidate of technical sciences,
senior research worker, Head of the Editorial and
Publishing Department of FGBNU «V.M. Gorbatov Federal
Research Center for Food Systems of Russian Academy
of Sciences», Moscow, Russia

Printing Office:

109316, Talalikhina str. 26, Moscow, Russia,
Gorbatov Research Center for Food Systems.
www.meatjournal.ru

Журнал зарегистрирован в Роскомнадзоре

Регистрационные данные:

ПИ № ФС77-71611 от 13.11.2017 года

ЭЛ № ФС77-71609 от 13.11.2017 года

Frequency — 4 issues a year.

Published in 2015.

Subscription index in the catalogue «Press of Russia» 38871

Signed print 24.09.18.

Circulation — 1000 copies. Order № 124.

Printing house — FNCFC.

© FNCFC, 2018

ISSN 2414-438X (Print)

ISSN 2414-441X (Online)

Editorial board:

Baiana A. Bazhenova, doctor of technical sciences, docent,
professor of the chair «Meat and canned product technology»,
FGBOU VPO East Siberia State University of Technology and
Management, Ulan-Ude, Russia

Georgy A. Belozarov, doctor of technical sciences, corresponding
members of RAS, Director of All-Russian Scientific Research
Institute of Refrigeration Industry — Branch of V.M. Gorbatov Federal
Research Center for Food Systems of RAS, Moscow, Russia

Ivan F. Gorlov, doctor of agricultural sciences, professor,
academician of RAS, Scientific supervisor of FGBNU «Povolzhskiy
Research Institute of Production and Processing of Meat and Dairy
Products», Volgograd, Russia

Irina Dederer, candidate of technical sciences, research worker,
Max Rubner-Institut, Kulmbach, Germany.

Vesna Djordjevic, doctor, director, the Institute of Meat Hygiene
and Technology, Belgrad, Serbia

Nina I. Dunchenko, doctor of technical sciences, professor, the
head of the chair «Product quality management and merchandise
knowledge», FGBUO Russian State Agrarian University —
Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Zhinibek D. Zhailaubaev, doctor of technical sciences,
academician of the Academy of Agricultural Sciences of the
Republic of Kazakhstan, Director of the Semey Branch of the
Kazakh Scientific Research Institute for Processing and Food
Industry, Semey, The Republic of Kazakhstan

Galia Zamaratskaya, candidate of technical sciences, docent,
research worker, the Swedish University of Agricultural Sciences,
Uppsala, Sweden

Alla A. Kochetkova, doctor of technical sciences, professor, the
head of the «Laboratory of food biotechnologies and specialized
products», FGBUN «Federal Research Centre of nutrition,
biotechnology and food safety», Moscow, Russia

Aliaksei V. Meliashchenia, candidate of economical sciences,
Director of NPRDUP «The Institute of Meat and Dairy Industry»
of the Republican Unitary Enterprise «The Scientific-practical
Center of the National Academy of Sciences of Belarus for food»,
Minsk, the Republic of Belarus

Sergey A. Miroshnikov, doctor of biological sciences, professor,
corresponding members of RAS, Director of FGBNU «The
All-Russian Research Institute of Beef Cattle», Orenburg, Russia

Liubov V. Rimareva, doctor of technical sciences, professor,
academician of RAS, Honored worker of science of the RF, deputy
director of The All-Russian Scientific Research Institute of Food
Biotechnology — branch FGBUN «Federal Research Centre of
nutrition, biotechnology and food safety», Moscow, Russia

Andrey I. Rud, doctor of agricultural sciences, chief research
worker of the Department of Genetics, biotechnology and
technology in pig of FGBNU «The All-Russian Research Institute
for Animal Husbandry named after academician L.K. Ernst»
Podolsk, Russia

Sakata Ryoichi, PhD, doctor, professor of agricultural sciences,
Azabu University, Sagami-hara, Japan

Anastasiya A. Semenova, doctor of technical sciences, professor,
Deputy Director of FGBNU «V.M. Gorbatov Federal Research
Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences»,
Moscow, Russia

Nikolai V. Timoshenko, doctor of technical sciences, professor,
the head of the chair «Technology of storage and processing of
animal products» of the Kuban State Agrarian University (Kub
SAU), Krasnodar, Russia

Roman A. Khanferyan, doctor of medical sciences, professor, the
head of the laboratory of Immunology, FGBUN «Federal Research
Centre of nutrition, biotechnology and food safety», Moscow,
Russia

СОДЕРЖАНИЕ

Ковалева О.А., Здрабова Е.М.
О ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
КОНЦЕНТРИРОВАННОГО СОКА ИЗ ЧЕРНИКИ
ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРОВАЯНОЙ СВИНИНЫ.... 4

Бабурина М.И., Вострикова Н.Л.,
Иванкин А.Н., Зенкин А.Н.
БИОХИМИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ
ПРИРОДНЫХ ЛИПИДОВ. ОБЗОР12

Лукинова Е.А., Котенкова Е.А.,
Полищук Е.К.
ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДОЛОГИИ
ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ..... 27

Вострикова Н.Л., Чернуха И.М.,
Хвостов Д.В.
МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ИДЕНТИФИКАЦИИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ
БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ, ФОРМИРУЮЩИХ
КОРРЕГИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
ИННОВАЦИОННЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ 36

Чернуха И.М., Ахремко А.Г.
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ
АВТОЛИТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОМА
МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ СВИНИНЫ И ГОВЯДИНЫ.... 56

Насонова В.В.
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
СУБПРОДУКТОВ..... 64

Гиро Т.М., Горлов И.Ф., Сложенкина М.И.,
Козлов С.В., Тасмуханов Н.В.
ПРИЖИЗНЕННОЕ ОБОГАЩЕНИЕ БАРАНИНЫ
ЭССЕНЦИАЛЬНЫМИ МИКРОЭЛЕМЕНТАМИ
С ЦЕЛЬЮ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ 74

Никитина М.А., Чернуха И.М.
МНОГОКРИТЕРИАЛЬНАЯ ОПТИМИЗАЦИЯ
РЕЦЕПТУРНОГО СОСТАВА ПРОДУКТА 89

CONTENTS

Oksana A. Kovaleva, Katherine M. Zdrabova
THE REASONABILITY OF BLUEBERRY
CONCENTRATED JUICE APPLICATION IN
THE MANUFACTURE OF DRY-CURED PORK ...4

Marina I. Baburina, Natal'ya L. Vostrikova,
Andrew N. Ivankin, Aleksandr N. Zenkin
BIOCHEMICAL TRANSFORMATION
OF NATURAL LIPIDS: A REVIEW..... 12

Ekaterina A. Lukinova, Elena A. Kotenkova,
Ekaterina K. Polischuk
INFLUENCE OF APPROACHES
TO ISOLATION OF ANIMAL
BIOACTIVE SUBSTANCES
ON ANTIMICROBIAL ACTION 27

Natal'ya L. Vostrikova, Irina M.
Chernukha, Daniil V. Khvostov
METHODOLOGICAL ASPECTS OF
IDENTIFICATION OF TISSUE-SPECIFIC
PROTEINS AND PEPTIDES FORMING
THE CORRECTIVE PROPERTIES OF
INNOVATIVE MEAT PRODUCTS 36

Irina M. Chernukha, Anastasiya G. Akhremko
COMPARATIVE STUDY OF AUTOLYTIC
CHANGES IN PORK AND BEEF MUSCLE
TISSUE PROTEOME 56

Viktoriya V. Nasonova
PERSPECTIVE WAYS
THE USE OF BY-PRODUCTS 64

Tatiana M. Giro, Ivan F. Gorlov, Marina I. Slozhenkina,
S.V. Kozlov, N.V. Tasmuchanov
IN VIVO ENRICHMENT OF THE LAMB
OF ESSENTIAL TRACE ELEMENTS
FOR ITS USE IN THE TECHNOLOGY
OF FUNCTIONAL FOODS..... 74

Marina A. Nikitina, Irina M. Chernukha
MULTI-CRITERIA OPTIMIZATION
OF A PRODUCT RECIPE COMPOSITION 89

О ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРИРОВАННОГО СОКА ИЗ ЧЕРНИКИ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРОВАЯНОЙ СВИНИНЫ

Ковалева О.А., Здрабова Е.М.*

Орловский государственный аграрный университет имени Н.В.Парахина, Орел, Россия

Ключевые слова: сыровяленые мясные продукты, концентрированный сок из черники, органолептический анализ, пищевая безопасность

Аннотация

Изучены аспекты применения концентрированного сока из черники в производстве сыровяленой свинины в качестве ингредиента посолочной смеси. Проведена органолептическая оценка полученных продуктов с использованием концентрированного сока из черники с разной концентрацией сухих веществ. Исследован химический состав готовых опытных продуктов. Изучено влияние концентрированного сока из черники на количество КМАФАнМ на поверхности продукта (бактериостатический эффект). Показано, что сыровяленая свинина, инъецированная посолочной смесью с концентрированным соком из черники, обладает более высокими вкусовыми и ароматическими характеристиками, улучшенной консистенцией. В работе дана оценка химического состава опытных образцов сыровяленой свинины. Показано, использование концентрированного сока из черники при посоле увеличивает содержание влаги и эссенциальных микронутриентов. Установлено, что количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов зависит от количества сухих веществ, в частности органических кислот, в концентрированном соке из черники, а именно — при увеличении концентрации сока из черники, используемого в составе посолочной смеси, количество КМАФАнМ на поверхности продукта уменьшается. Концентрированный сок из черники действует как ингибитор роста патогенной микрофлоры. На основании проведенных исследований установлено оптимальное содержание сухих веществ для применения концентрированного сока из черники при посоле сыровяленой свинины.

Original scientific paper

THE REASONABILITY OF BLUEBERRY CONCENTRATED JUICE APPLICATION IN THE MANUFACTURE OF DRY-CURED PORK

Oksana A. Kovaleva, Katherine M. Zdrabova*

The Orel State Agrarian University name N.V.Parahina, Orel, Russia

Key words: dry-cured meat products, concentrated blueberry juice, organoleptic analysis, food safety

Abstract

The aspects of the blueberry concentrated juice application in the production of dried pork as an ingredient of the salt mixture were studied. The organoleptic evaluation of the obtained products using concentrated blueberry juice with different concentrations of solids was carried out. The chemical composition of the finished experimental products is investigated. The influence of the concentrated juice of blueberries to the number of QMAFAnM on the surface of the product (bacteriostatic effect). It is shown that dry-cured pork, injected with a salt mixture with concentrated blueberry juice, has higher taste and aromatic characteristics, improved consistency. In this work, the chemical composition of experimental samples of dry-cured pork is evaluated. It is shown that the use of concentrated blueberry juice in salting increases the moisture content and essential micronutrients. Was found that the number of mesophilic aerobic and facultative-anaerobic microorganisms depends on the amount of dry substances, in particular organic acids, in concentrated blueberry juice, namely, with an increase in the concentration of blueberry juice used in the salt mixture, the amount of QMAFAnM on the surface of the product decreases. Concentrated blueberry juice acts as an inhibitor of growth of pathogenic microflora. On the basis of the conducted researches the optimum content of dry substances for application of the concentrated juice from blueberries at a salting of dry pork is established.

Введение

Российский рынок мяса считается одним из самых крупных секторов продовольственного рынка. Он характеризуется высокой емкостью и стабильным спросом, является привлекательным для инвесторов и отличается жестким уровнем конкуренции среди

производителей [1]. Мясоперерабатывающий сектор российской экономики является одним из основных жизнеобеспечивающих секторов, оказывающим решающее влияние на уровень продовольственного обеспечения страны и определяющим здоровье нации. Сегодня особое значение придается созданию

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Ковалева О.А., Здрабова Е.М. О целесообразности применения концентрированного сока из черники при производстве сыровяленой свинины. Теория и практика переработки мяса. 2018; 3(3):4–11. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-4-11

FOR CITATION: Kovaleva O.M., Zdrabova K.M. The reasonability of blueberry concentrated juice application in the manufacture of dry-cured pork. Theory and practice of meat processing. 2018; 3(3): 4–11. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-4-11

технологической основы для получения качественных продуктов, выполняющих лечебные и профилактические функции. Такие продукты называются функциональными и их относят к группе «здоровье» [2].

В последние годы в пищевой промышленности, как за рубежом, так и в нашей стране развивается новое направление — разработка рецептур и технологических подходов к созданию продуктов функционального питания, которые по компонентному составу, биологической и пищевой ценности соответствуют требованиям системы FOSHU (Food for Specific Health Use — специфические продукты для здоровья) [3,4].

По мнению ряда ученых [2,3,4,5,6] разработка концепции «Функциональное питание» явилась одним из достижений конца XX века, поскольку она затрагивает многие фундаментальные и прикладные аспекты здоровья человека, медицины, нутрициологии и биотехнологии.

Разработка функциональных мясных продуктов имеет свои особенности, так как необходимо сохранить биологическую активность добавки в процессе технологической обработки сырья и не ухудшить качественные показатели готового изделия.

Совершенствование ассортимента может быть достигнуто путем сокращения количества высококалорийных изделий, замены животных жиров на растительные, пополнения линейки диетических и диабетических изделий, а также биологически полноценных продуктов.

К физиологически функциональным пищевым ингредиентам относят биологически активные и/или физиологически ценные, безопасные для здоровья, имеющие точные физико-химические характеристики ингредиенты, для которых выявлены и научно обоснованы свойства, установлены нормы ежедневного употребления в составе пищевых продуктов, полезные для сохранения и улучшения здоровья. Это витамины, минеральные вещества, полиненасыщенные жирные кислоты, антиоксиданты, пищевые волокна, молочнокислые микроорганизмы, минеральные компоненты и жизненно важные вещества растительного происхождения [5,7].

При производстве функциональных мясных продуктов, обогащенных ингибиторами окисления жиров, применяются растительные экстракты с антиоксидантными свойствами, полученные из розмарина, чая, сои, кожуры цитрусовых, различных плодов и ягод и т.д., которые содержат биофлавоноиды [8].

Ценность дикорастущих ягодных растений состоит в том, что они имеют высокую приспособленность к местным условиям и проявляют иммунитет ко многим заболеваниям. Кроме того, дикорастущие ягоды по содержанию многих биологически активных веществ опережают культурные. Особое место среди дикорастущих ягод занимает черника. Плоды черники содержат до 230 мг% Р-активных соединений,

до 37 мг% аскорбиновой кислоты, а также витамины группы В, микроэлементы (калий, натрий, кальций, магний, фосфор, железо), органические кислоты, пектиновые вещества. Пектиновые вещества, содержащиеся в чернике, способствуют выведению из организма солей тяжелых металлов, токсинов и шлаков [9].

Сыровяленые мясные продукты имеют высокую биологическую ценность и высокие вкусовые характеристики, благодаря отсутствию термической обработки [10]. Ряд исследований подтвердил данные о том, что при вялении в результате биохимических процессов образуются сложные белково-липидные комплексы, которые определяют уникальные вкусовые, потребительские, а также полезные характеристики конечного продукта [11,12,13].

Таким образом, разработка рецептуры мясного сыровяленого продукта с черникой и оценка его органолептических показателей бактериостатического эффекта использования черники является актуальным.

Исследования были направлены на изучение влияния концентрированного сока из черники на химический состав, органолептические показатели готового сыровяленого продукта из свинины и бактериостатические свойства черничного концентрированного сока.

Объекты и методы

Объектами исследований явились:

- концентрированный сок из черники содержащий 70,0 % сухих веществ (компания Dinamic Health Laboratories, пр-во США);
- контрольный образец (К) — сыровяленая свинина, выработанная из филейной части свинины (loin de suilla) по ТУ 9213–001–31148759–2015 «Изделия мясные сушено-вяленые: «Бастурма» и «Суджук»;
- мясной образец (П-1) — сыровяленая свинина, выработанная с использованием сока черники с содержанием 18,5 % сухих веществ;
- мясной образец (П-2) — сыровяленая свинина, выработанная с использованием сока черники с содержанием 35,0 % сухих веществ.

Концентрированный сок из черники разбавляли дистиллированной водой для мясного образца П-1 из расчета 1:4, для мясного образца П-2 разведение 1:2.

Концентрированный сок из черники, предварительно разведенный до указанного выше содержания сухих веществ вводили методом инъектирования на этапе посола.

Определение массовой доли влаги проводили согласно ГОСТ 33319–2015, белка — ГОСТ 25011–81, жира — ГОСТ 23042–2015 общей золы — ГОСТ 31727–2012, водородный показатель (рН) — ГОСТ Р 51478–99 (ИСО 2917–74). Сенсорный анализ экспериментальных образцов проводили по 9-балльной шкале. Оценку бактериостатического эффекта (количество КМАФАнМ на поверхности изделия) применения

концентрированного сока из черники проводили путем инкубирования посевов при температуре 30 ± 1 °C в течение 72 часов с дальнейшим подсчетом количества колоний, выросших на чашках Петри.

Результаты и обсуждение

Зарубежными учеными (Perez-Alvarez J. A., 2008) показана положительная динамика сенсорных и бактериостатических исследований при добавлении в мясную систему тех или иных растительных добавок [13]. Потребительская оценка продукта проводится по шкале, включающей ряд органолептических показателей мясного продукта, и является важным фактором, определяющим уровень потребительского спроса на продукт. Балльная система позволяет систематизировать многообразие ощущений и выразить их в стройной системе, где каждый показатель качества определен словесно.

Наиболее рациональными при оценке мяса и мясных продуктов считают 5-ти и 9-балльные шкалы. 9-балльная шкала является модификацией 5-балльной шкалы, в которой 0,5 — балла соответствуют одному баллу.

Важным показателем при разработке сыровяленых мясных изделий из свинины является вкус образцов. В последнее время большим спросом пользуются деликатесные мясные изделия со специфическим ароматом и вкусом, которые сформированы целенаправленным воздействием на мясное сырье различных добавок (бактериальные препараты, функциональные добавки и проч.) [14].

В последнее время большим спросом пользуются деликатесные мясные продукты со специфическими ароматом и вкусом, которые сформированы целенаправленным воздействием на мясное сырье. Результаты органолептического анализа, образец П-1 имеет слабо выраженный ягодный вкус, обусловленный

степенью обезвоженности концентрированного сока черники. Образец П-2 имеет выраженный ягодный, кисло-сладкий вкус, приятный аромат, который придает продукту пикантность. Положительные показатели качества продукта приведены в Табл. 1.

Балльная оценка результатов органолептического анализа показала, что контрольный образец К получил самый низкий балл по вкусовым характеристикам — 5,73 балла, опытные образцы превосходили контроль соответственно у образец П-1—7,72 балла, образец П-2—8,46 балла (Табл. 2).

Внешний вид мясных продуктов не зависит от разведения и концентрации сока в составе посолочной смеси.

При увеличении концентрации сока в образце П-2 продукт приобретает более насыщенную окраску и более выраженный аромат с оттенками черники. Соответственно балльная оценка по указанным органолептическим показателям — 6,93 балла по цвету, 7,43 балла по аромату.

Данные сенсорной оценки дают возможность предположить, что увеличение концентрации сока и присутствующих в нем органических кислот улучшают структуру опытных образцов. Консистенция в образцах П-1 и П-2 с использованием сока консистенция однородная и более выраженная по сравнению с контрольным образцом (7,52 балла, 7,88 балла и 6,64 балла соответственно).

Результаты сенсорного анализа показали, что опытные образцы с применением концентрированного сока из черники имеют более высокие баллы по сравнению с контрольным образцом. Самый высокий средний балл получил мясной продукт из свинины П-2 с массовой долей концентрированного сока из черники 35,0 %.

Анализ химического состава мясных образцов показал, что продукты с применением концентрированного

Таблица 1. Оценка органолептических показателей мясных образцов

Образец	Внешний вид	Вид на срезе	Цвет	Запах (аромат)	Консистенция	Сочность	Вкус
1	2	3	4	5	6	7	8
Мясной образец П-1	Очень красивый	Красивый	Красивый	Ароматный	Нежная	Сочное	Вкусный
Мясной образец П-2	Очень красивый	Очень красивый	Красивый	Ароматный	Нежная	Сочное	Вкусный
Контрольный образец К	Красивый	Хороший	Красивый	Недостаточно ароматный	Недостаточно нежная	Достаточно сочное	Достаточно вкусный

Таблица 2. Сенсорный анализ мясных образцов

Образец	Внешний вид	Цвет	Аромат	Консистенция	Вкус	Средний общий балл
1	2	3	4	5	6	7
Мясной образец П-1	$7,57 \pm 0,21^*$	$6,62 \pm 0,22$	$7,63 \pm 0,31$	$7,52 \pm 0,31$	$7,72 \pm 0,25^*$	$7,59 \pm 0,27$
Мясной образец П-2	$7,82 \pm 0,25$	$6,93 \pm 0,18^*$	$7,43 \pm 0,34^{**}$	$7,88 \pm 0,24$	$8,46 \pm 0,22$	$8,05 \pm 0,26$
Контрольный образец К	$7,51 \pm 0,24$	$6,15 \pm 0,22$	$7,64 \pm 0,28$	$6,64 \pm 0,24$	$5,73 \pm 0,21$	$6,78 \pm 0,24^*$

* $p \leq 0,05$ (вероятность ошибки)

Таблица 3. Химический состав мясных образцов

Показатель	Контроль	Мясной образец П-1	Мясной образец П-2
Массовая доля влаги, %	37,43 ± 0,13	39,77 ± 0,02*	39,83 ± 0,04
Массовая доля белка, %	24,21 ± 0,14	23,44 ± 0,19*	23,56 ± 0,15*
Массовая доля жира, %	15,71 ± 0,16	14,18 ± 0,14	14,29 ± 0,21
Массовая доля углеводов, %	2,19 ± 0,04	2,74 ± 0,03*	3,08 ± 0,03
Массовая доля золы, %	2,19 ± 0,02	2,61 ± 0,05	2,69 ± 0,04*
Концентрация водородных показателей, pH	4,8	5,7*	5,6*

* $p \leq 0,05$ (вероятность ошибки)

ного сока черники удерживают больше влаги (Табл. 3). Более высокой влажности продуктов соответствует более высокий показатель pH. Увеличенное содержание влаги привели к снижению содержащихся в мясных опытных продуктах белков и жиров. Однако за счет содержащихся в концентрированном черничном соке углеводов (представленных преимущественно пектинами и фруктозой), массовая доля углеводов в опытных образцах была выше.

Массовая доля золы в опытных образцах также была выше, по сравнению с контрольным образцом. Считаем, что представленные зольными компонентами эссенциальные микронутриенты (минеральные вещества и витамины) могут придавать сыровяленой свинине с концентрированным соком черники функциональные свойства. Но это станет предметом дальнейших исследований.

Микробиологическими исследованиями установлено, что количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов зависит от концентрации введенного в посолочную смесь концентрированного сока черники. Как показали исследования, при увеличении содержания сухих веществ в концентрированном соке черники количество КМАФАнМ в продукте уменьшается (Табл. 4).

Таблица 4. Содержание КМАФАнМ в мясных образцах

Образец	КМАФАнМ, КОЕ в 1 г
Мясной образец П-1	0,572 · 10 ³
Мясной образец П-2	0,531 · 10 ³
Контрольный образец К	0,601 · 10 ³

Предполагаем, что ингибирующий рост микрофлоры в продукте эффект связан с тем, что концентрированный сок черники содержит в своем составе биологически активные ферменты и ингибиторы окислительных процессов, органические кислоты (лимонная, яблочная, янтарная, аскорбиновая) (Рис. 1).

Аналогичный эффект был установлен в ранее проводимых исследованиях с концентрированными соками черной смородины при производстве карпаччо из мяса птицы [15].

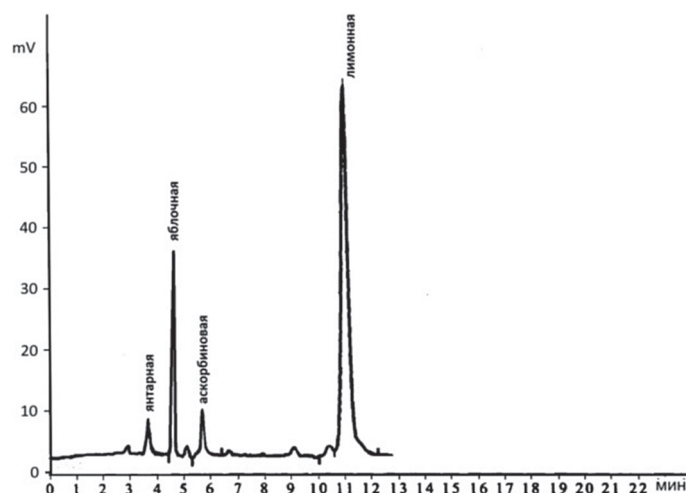


Рис. 1. Хроматограмма органических кислот концентрированного сока черники

Выводы

Концентрированный сок из черники улучшает потребительские свойства сыровяленой свинины, а именно вкус, аромат, консистенцию,

При инъектировании свинины посолочной смесью с концентрированным соком из черники происходит увеличение массовой доли влаги в опытных образцах по сравнению с контрольным образцом. Увеличивается содержание углеводов за счет пектинов и фруктозы, содержащихся в чернике.

Применение концентрированного сока из черники увеличивает срок хранения за счет увеличения бактериостатического эффекта на поверхности продукта.

Поскольку концентрированный сок из черники с содержанием сухих веществ в количестве 35,0 % в составе посолочной смеси позволил получить продукт с более выраженными вкусовыми и ароматическими характеристиками, а также снизить содержание бактериальной микрофлоры на поверхности готового продукта, считаем целесообразным использовать для расширения ассортимента деликатесных функциональных продуктов из свинины концентрированный сок из черники разведением 1:2.

Introduction

The Russian meat market is considered to be one of the largest sectors of the food market. It is characterized by high capacity and stable demand, is attractive to investors and is characterized by a strong level of competition among manufacturers [1]. The meat-processing sector of the Russian economy is one of the main life-supporting sectors, which has a decisive influence on the level of food supply of the country and determines the health of the nation. Today, special importance is attached to the creation of a technological basis for obtaining quality products that perform therapeutic and preventive functions. Such products are called functional and belong to the group «health» [2].

In recent years, in the food industry, both abroad and in our country, a new direction has been developing — the development of recipes and technological approaches to the creation of functional food products that meet the requirements of the FOSHU system (Food for Specific Health Use — specific health products) in terms of component composition, biological and nutritional value [3,4].

According to a number of scientists [2,3,4,5,6], the development of the concept of «Functional nutrition» was one of the achievements of the late twentieth century, as it affects many fundamental and applied aspects of human health, medicine, nutrition and biotechnology.

The development of functional meat products has its own characteristics, as it is necessary to preserve the biological activity of additives in the process of processing of raw materials and not to make worse the quality of the finished product.

Improvement of the range can be achieved by reducing the number of high-calorie products, replacing animal fats with vegetable ones, replenishing the line of dietary and diabetic products, as well as biologically complete products.

The physiologically functional food ingredients include biologically active and / or physiologically valuable, safe for health, having accurate physical and chemical characteristics of the ingredients for which the properties are identified and scientifically justified, the norms of daily use in the composition of food, useful for the preservation and improvement of health. These are vitamins, minerals, polyunsaturated fatty acids, antioxidants, dietary fibers, lactic acid microorganisms, mineral components and vital substances of plant origin [5,7].

In the production of functional meat products enriched with fat oxidation inhibitors, plant extracts with antioxidant properties obtained from rosemary, tea, soy, citrus peel, various fruits and berries, etc., which contain bioflavonoids [8] are used.

The value of wild berry plants is that they are highly adapted to local conditions and are immune to many diseases. In addition, wild berries content of many biologically active substances ahead of cultural. A special place among wild berries has blueberry. Blueberry fruits contain up to 230 mg% p-active compounds, up to 37 mg% ascorbic acid, as well as b vitamins, minerals (potassium,

sodium, calcium, magnesium, phosphorus, iron), organic acids, pectin substances. Pectin substances contained in blueberry contribute to the excretion of salts of heavy metals, toxins and slags [9].

Dry-cured meat products have a high biological value and high taste characteristics, due to the absence of heat treatment [10]. A number of studies have confirmed the data that during drying as a result of biochemical processes complex protein-lipid complexes are formed, which determine the unique taste, consumer, and useful characteristics of the final product [11,12,13].

Thus, the development of a recipe for a raw meat product with blueberries and the assessment of its organoleptic characteristics of the bacteriostatic effect of the use of blueberry is relevant.

The research was aimed at studying the effect of concentrated blueberry juice on the chemical composition, organoleptic characteristics of the finished raw product from pork and bacteriostatic properties of blueberry concentrated juice.

Objects and methods

The objects of research were:

- concentrated juice of blueberry contains 70.0 % of dry matter (the company Dinamic Health Laboratories, made in USA);
- control sample (K)-dry-cured pork, made of pork loin (loin de suilla) according to TU9213-001-31148759-2015 «meat dried-dried Products: «Basturma» and «Sujuk»;
- meat sample (P-1) — dry-cured pork produced using blueberry juice with a content of 18.5 % solids;
- a meat sample (P-2) — dried pork produced with the use of blueberry juice with a content of 35.0 % solids.

Concentrated blueberry juice was diluted with distilled water for meat sample P-1 at the rate of 1:4, for meat sample P-2 dilution of 1: 2.

Concentrated blueberry juice, pre-diluted to the above solids content was introduced by grouting at the stage of the Ambassador.

Determination of the mass fraction of moisture was carried out according to GOST 33319-2015, protein — GOST 25011-81, fat — GOST 23042-2015 of total ash — GOST 31727-2012, hydrogen index (pH) — GOST R51478-99 (ISO 2917-74). The sensory analysis of experimental samples was carried out on a 9-point scale. Evaluation of bacteriostatic effect (the amount of QMAFAnM on the surface of the product) of concentrated blueberry juice was carried out by incubating the crops at a temperature of 30 ± 1 °C during 72 hours with further calculation of the number of colonies grown on Petri dishes.

Results and discussion

Foreign scientists (Perez-Alvarez J. A., 2008) showed positive dynamics of sensory and bacteriostatic studies when adding certain plant additives to the meat system [13]. Consumer product evaluation is carried out on a scale

Table 1. Definition of organoleptic characteristics of meat samples

Sample	Appearance	Slice view	Color	Aroma	Consistency	Juiciness	Flavor
1	2	3	4	5	6	7	8
Meat sample P-1	Very beautiful	Beautiful	Beautiful	Fragrant	Gentle	Juicy	Tasty
Meat sample P-2	Very beautiful	Very beautiful	Beautiful	Fragrant	Gentle	Juicy	Tasty
Control sample K	Beautiful	Good	Beautiful	Insufficiently fragrant	Quite gentle	Quite juicy	Quite tasty

Table 2. Sensory analysis of meat samples

Sample	Appearance	Color	Aroma	Consistency	Flavor	Average overall score
1	2	3	4	5	6	7
Meat sample P-1	7.57 ± 0.21*	6.62 ± 0.22	7.63 ± 0.31	7.52 ± 0.31	7.72 ± 0.25*	7.59 ± 0.27
Meat sample P-2	7.82 ± 0.25	6.93 ± 0.18*	7.43 ± 0.34**	7.88 ± 0.24	8.46 ± 0.22	8.05 ± 0.26
Control sample K	7.51 ± 0.24	6.15 ± 0.22	7.64 ± 0.28	6.64 ± 0.24	5.73 ± 0.21	6.78 ± 0.24*

* $p \leq 0.05$ (error probability)

that includes a number of organoleptic characteristics of the meat product, and is an important factor determining the level of consumer demand for the product. The point system allows you to systematize the variety of sensations and express them in a coherent system, where each indicator of quality is defined verbally.

The most rational in the definition of meat and meat products is considered 5 and 9 point scale. The 9 point scale is a modification of the 5 point scale, in which 0.5 points correspond to one point.

An important indicator in the development of dry meat products from pork is the taste of the samples. In recent years, great demand for delicate meat products with a specific aroma and taste, which are formed by the targeted impact on the meat raw materials of various additives (bacterial preparations, functional additives, etc.). [14].

In recent years, great demand for delicious meat products with a specific aroma and taste, which are formed by a targeted impact on the raw meat results of organoleptic analysis, sample P-1 has a slightly pronounced berry taste, due to the degree of dehydration of concentrated blueberry juice. Sample P-2 has a pronounced berry, sour-sweet taste, pleasant aroma, which gives the product a piquancy. Positive indicators of product quality are given in the Table 1.

Score definition of the results of organoleptic analysis showed that the control sample K received the lowest score

in taste characteristics-5.73 points, the test samples exceeded the control, respectively, in the sample P-1-7.72 points, sample P-2-8.46 points (Table 2).

The appearance of meat products does not depend on the dilution and concentration of the juice in the salt mixture.

When the concentration of juice in the sample P-2 increases, the product acquires a more saturated color and a more pronounced flavor with shades of blueberries. Accordingly, the score for the specified organoleptic characteristics — 6.93 points in color, 7.43 points for flavor.

The data of the sensory evaluation suggest that the increase in the concentration of juice and organic acids present in it improve the structure of the test samples. Consistency in samples P-1 and P-2 using juice consistency is homogeneous and more pronounced compared to the control sample (7.52 points, 7.88 points and 6.64 points, respectively).

The results of sensory analysis showed that the experimental samples using concentrated blueberry juice have higher scores compared to the control sample. The highest average score was the meat product of pork P-2 with a mass fraction of concentrated juice from blueberries 35.0 %.

Analysis of the chemical composition of meat samples showed that products using concentrated blueberry juice retain more moisture (Table 3). Higher moisture content

Table 3. Chemical composition of meat samples

Rate	Control	Meat sample P-1	Meat sample P-2
Mass fraction of moisture, %	37.43 ± 0.13	39.77 ± 0.02*	39.83 ± 0.04
Mass fraction of protein, %	24.21 ± 0.14	23.44 ± 0.19*	23.56 ± 0.15*
Mass fraction of fat, %	15.71 ± 0.16	14.18 ± 0.14	14.29 ± 0.21
Mass fraction of carbohydrates, %	2.19 ± 0.04	2.74 ± 0.03*	3.08 ± 0.03
Mass fraction of ash, %	2.19 ± 0.02	2.61 ± 0.05	2.69 ± 0.04*
Concentration of hydrogen indicators, pH	4.8	5.7*	5.6*

- $p \leq 0.05$ (error probability)

corresponds to a higher pH. The increased moisture content resulted in a decrease in proteins and fats contained in meat products. However, due to the carbohydrates contained in concentrated blueberry juice (mainly represented by pectins and fructose), the mass fraction of carbohydrates in the experimental samples was higher.

The mass fraction of ash in the test samples was also higher compared to the control samples. We believe that the essential micronutrients (minerals and vitamins) presented by the ash components can impart functional properties to the dry-cured pork with concentrated blueberry juice. But this will be the subject of further research.

Microbiological studies have found that the number of mesophilic aerobic and facultative-anaerobic microorganisms depends on the concentration introduced into the salt mixture of concentrated blueberry juice. As studies have shown, with an increase in the content of dry substances in the concentrated blueberry juice, the amount of number of QMAFAnM in the product decreases (Table 4).

Table 4. Content of number of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms in meat samples

Sample	QMAFAnM, КОЕ в 1 г
Meat sample P-1	$0.572 \cdot 10^3$
Meat sample P-2	$0.531 \cdot 10^3$
Control sample K	$0.601 \cdot 10^3$

We assume that the effect of inhibiting the growth of microflora in the product is due to the fact that the concentrated blueberry juice contains biologically active enzymes and inhibitors of oxidative processes, organic acids (citric, malic, succinic, ascorbic) (Figure 1).

A similar effect was established in the previous studies with concentrated black currant juices in the production of carpaccio of poultry [15].

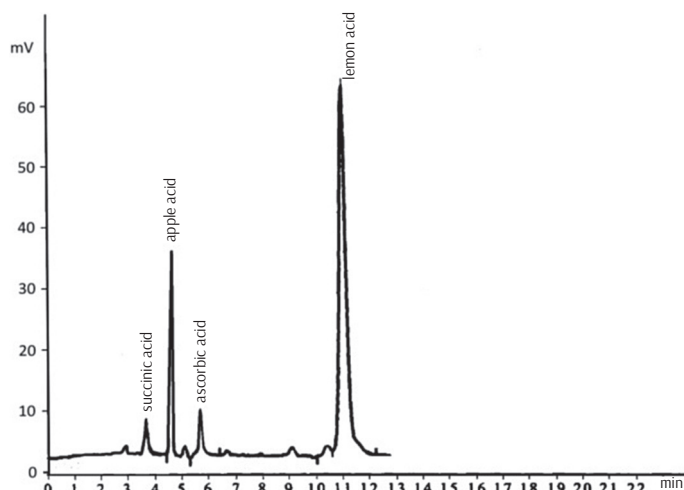


Figure 1. The chromatogram of the organic acids of concentrated blueberry juice

Conclusion

Concentrated blueberry juice improves consumer properties of dry-cured pork, namely taste, aroma, consistency,

When projecting pork with a salt mixture with concentrated blueberry juice, the mass fraction of moisture in the test samples is increased compared to the control sample. Increases the content of carbohydrates due to the pectin and fructose, found in blueberries.

The use of concentrated blueberry juice increases the shelf life by increasing the bacteriostatic effect on the surface of the product.

Since the concentrated juice of blueberries with a content of dry substances in the amount of 35.0 % in the composition of the salt mixture allowed to obtain a product with more pronounced taste and aromatic characteristics, as well as to reduce the content of bacterial microflora on the surface of the finished product, we consider it appropriate to use a concentrated juice of blueberries 1:2 dilution.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Государственная программа развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2013–2020 годы [Электронный ресурс: <http://agroportal2.garant.ru:81/SESSION/PILOT/main.htm>. Дата обращения 14.06.2018 г]
2. Chernukha, I. M., Fedulova, L.V., Kotenkova, E.A. (2013). The study of risk factor and consequences of alimentary atherosclerosis in Wistar rat. *Maso. Reznické noviny*, 6, 28–30.
3. Гиро, Т.М., Андреева, С.В. (2007). Функциональные мясные продукты с добавлением тыквенного порошка. *Мясная индустрия*, 10, 43–44.
4. Антипова, Л. В., Зубаирова, Л.А., Гизатов, А.Я., Данылиев, М.М. (2005). Продукты функционального питания на основе биомодифицированного сырья. *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*, 4, 31–34.
5. Semenova, A.A., Kuznjecova, T.G., Nasonova, V.V. (2008). Possibilities to application of dihydroquercetin for stabilising quality of sausages produced from mechanically deboned poultry meat. *Tehnologija mesa*, 3–4, 113–116.
6. Arihara, K. (2004). Functional foods. In W. K. Jensen, C. Devine, & M. Dikeman (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences* (pp. 492–499). Oxford: Elsevier.
7. Гизатов, А. Я., Гизатова, Н.В. (2014). Перспективы использования растительного пектина для создания здорового питания. *Материалы Международной научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов. Белгород, Белгородский университет кооперации, экономики и права*, 302–305
8. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание по состоянию на 1 апреля 2009 года: в 2-х т. М.: Медицинский совет. 2009. — 1359 с.
9. Куркин, В.А., Рязанова, Т.К., Петрухина, И.К. (2014). Черника обыкновенная: современные подходы к стандартизации сырья и созданию лекарственных препаратов. Самара, Офорт. — 126 с. ISBN 978–5–473–00973–6
10. Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J.P., Bover-Cid, S., Vidal-carou, M.C., Talon, R. (2007). Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*, 76(1), 112–122.
11. Дымар, О.В., Гордынец, С.А., Калтович, И.В. (2015). Новые виды функциональных мясных продуктов иммуномодулирующей направленности. *Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова М, ВНИИМП*, 166–170
12. Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E.J., Ahn, D.U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86(1), 15–31.
13. Perez-Alvarez, J. A. (2008). Overview of meat products as functional foods. *Technological strategies for functional meat products development*, 1–17.

14. Формирование вкуса и аромата сыровяленых изделий под влиянием бактериальных препаратов [Электронный ресурс: <http://webpticeprom.ru/ru/articles-processing-production.html>. Дата обращения 20.06.2018 г]

15. Шалимова, О.А., Киреева, О.С., Стромская, И.Я., Емельянов, А.А. (2010). Съедобные пищевые пленки из концентрированных ягодных соков для вареных колбасных изделий. *Мясная индустрия*, 3, 56–58.

REFERENCES

1. State program for the development of agriculture and regulation of markets for agricultural products, raw materials and food for 2013–2020 [Electronic resource: <http://agroportal2.garant.ru:81/SESSION/PILOT/main.htm>. Access date 14.06.2018] (In Russian)
2. Chernukha, I. M., Fedulova, L.V., Kotenkova, E.A. (2013). The study of risk factor and consequences of alimentary atherosclerosis in Wistar rat. *Maso. Reznické noviny*, 6, 28–30.
3. Giro, T.M., Andreeva, S.V. (2007). Functional meat products added with powdered pumpkin. *Meat industry*, 10, 43–44. (In Russian)
4. Antipova, L.V., Zubairova, L.A., Gizatov, A.Ya., Daniliv, M.M. (2005). Functional food products based on biomodified raw materials. *News of higher educational institutions. Food technology*, 4, 31–34. (In Russian)
5. Semenova, A.A., Kuznjecova, T.G., Nasonova, V.V. (2008). Possibilities to application of dihydroquercetin for stabilising quality of sausages produced from mechanically deboned poultry meat. *Tehnologija mesa*, 3–4, 113–116.
6. Arihara, K. (2004). Functional foods. In W. K. Jensen, C. Devine, & M. Dikeman (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences* (pp. 492–499). Oxford: Elsevier.
7. Gizatov, A.Ya., Gizatova, N.V. (2014). Prospects for using vegetable pectin to create a healthy diet. *Materials of the International scientific-practical conference of faculty and post-graduate students. Belgorod, Belgorod University of Cooperation, Economics and Law*, 302–305. (In Russian)
8. State Register of Medicines. Official publication as of April 1, 2009: in 2 volumes. M: Medical advice, 2009. — 1359 p. (In Russian)

9. Kurkin, V.A., Rayzanova, T.K., Petrushina, I.K. (2014). Blueberry ordinary: modern approaches to the standardization of raw materials and the creation of medicines. Samara: Ofort. — 126 p. ISBN978–5–473–00973–6 (In Russian)
10. Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J.P., Bover-Cid, S., Vidal-carou, M.C., Talon, R. (2007). Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*, 76(1), 112–122.
11. Dymar, O.V., Gordynets, S.A., Kaltovich, I.V. (2015). New types of functional meat products of immunomodulatory direction. *International scientific and practical conference dedicated to the memory of Vasily Matveyevich Gorbatov. M: VNIIMP*, 166–170. (In Russian)
12. Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E.J., Ahn, D.U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86(1), 15–31.
13. Perez-Alvarez, J. A. (2008). Overview of meat products as functional foods. *Technological strategies for functional meat products development*, 1–17.
14. Formation of taste and aroma of smoke products under the influence of bacterial preparations [Electronic resource: <http://webpticeprom.ru/ru/articles-processing-production.html>. Access date 20.06.2018] (In Russian)
15. Shalimova, O.A., Kireeva, O.S., Stromskaya, I.Ya., Emel'yanov, A.A. (2010). Food films from concentrated berry juices for cooked sausages. *Meat industry*, 3, 56–58. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Ковалева Оксана Анатольевна — доктор биологических наук, директор Инновационного научно-исследовательского испытательного центра, Орловский государственный аграрный университет имени Н.В.Парахина
302019, Орел, ул. Генерала Родина, 69
Тел.: +7–4862–47–51–71
E-mail: iniic@mail.ru

Здрабова Екатерина Михайловна — кандидат технических наук, научный сотрудник Инновационного научно-исследовательского испытательного центра, Орловский государственный аграрный университет имени Н.В.Парахина,
302019, Орел, ул. Генерала Родина, 69
Тел.: +7–4862–47–51–71
E-mail: iniic@mail.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 21.06.2018

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Oksana A. Kovaleva — doctor of biological sciences, Director of the Innovation scientific-research test center, Orel state agrarian University named after N. In.Parahina, 302019
Orel, Generala Rodina str., 69
Tel.: +7–4862–47–51–71
E-mail: iniic@mail.ru

Katherine M. Zdrabova — candidate of technical sciences, research scientist of the Innovation scientific-research test center, Orel state agrarian University named after N. In.Parahina
302019, Orel, Generala Rodina str., 69
Tel.: +7–4862–47–51–71
E-mail: iniic@mail.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 21.06.2018

БИОХИМИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ ПРИРОДНЫХ ЛИПИДОВ. ОБЗОР

Бабурина М.И.¹, Вострикова Н.Л.¹, Иванкин А.Н.^{1,2,*}, Зенкин А.Н.²

¹ Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

² Московский государственный технический университет (национальный исследовательский университет) им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия

Ключевые слова: липиды, природные животные жиры, переработка

Аннотация

Рассмотрены вопросы биохимической трансформации природных липидов растительного, рыбного и животного происхождения по примеру биотехнических аспектов превращения триглицеридов в продукты разнообразного назначения. Представлены показатели биологической эффективности жиров и масел, с точки зрения систематизации по группам полиненасыщенных, мононенасыщенных и насыщенных жирных кислот. Обсуждены некоторые особенности моделирования естественных процессов гидролитического распада жиров и масел в энергоёмкие продукты. При этом изучены аспекты потребления жиров и их биохимическая трансформация в пищеварительных системах под действием собственных ферментов человека и биохимическая конверсия липидов *in vitro* в присутствии коммерческих ферментных препаратов. Рассмотрены вопросы преобразования (конверсии) свободных жирных кислот в эфиры, для целесообразности обоснования их применения.

Review paper

BIOCHEMICAL TRANSFORMATION OF NATURAL LIPIDS: A REVIEW

Marina I. Baburina¹, Natal'ya L. Vostrikova¹, Andrew N. Ivankin^{1,2,*}, Aleksandr N. Zenkin²

¹ V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia

Key words: lipids, natural animal fats, processing

Abstract

The aspects of biochemical transformation of natural lipids of vegetable, fish, and animal origin are considered on the model of biotechnical aspects of triglyceride transformation into products of various purpose. The indicators of biological efficacy of fats are presented regarding the systematization by groups of polyunsaturated, monounsaturated and saturated fatty acids. Some features of simulation of natural processes of hydrolytic fat degradation into energy-intensive products are discussed. At the same time, aspects of fat intake and their biochemical transformation in food systems by human enzymes, and biochemical transformation of lipids *in vitro* in the presence of commercial enzyme preparations were studied. The aspects of free fatty acid transformation into esters are considered for justifying their use.

Основная часть

Природные липиды являются важнейшими составляющими продукции сельскохозяйственного производства, которые широко используются на пищевые, во многом определяя пищевую и биологическую полноценность и вкусовые качества, и технические цели [1]. Основная масса таких липидов представлена животными, рыбными жирами, а также растительными маслами [2,3,4].

Все липиды природного происхождения на 96–98 % — это смесь триглицеридов формулы $\text{ROCH}_2\text{CH(OR)CH}_2\text{OR}$, где R выражены алифатическими остатками жирных кислот. Разнообразие жирных кислот в составе липидов определяет пищевую ценность, понимаемую как «качество жира»

[5,6]. Химически триглицериды природных липидов представляют собой глицерин, этерифицированный R-остатками $\text{C}_6\text{--C}_{24}$ жирных кислот [7,8]. Основная масса природных липидов используется на пищевые цели в составе разнообразных продуктов питания.

Химический состав животных и растительных жиров и масел имеет весьма существенное значение для характеристики пищевой ценности с учетом высокого уровня усвоения. Для свиного жира он обычно составляет 96...98 %, растительных масел — 95...99 %, сливочного масла — 93...99 %, против 80...94 % для говяжьего и 80...90 % для бараньего жиров [9,10,11].

Липиды — важные ингредиенты пищи человека, так как обладают высокой энергетической ценностью

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Бабурина М.И., Вострикова Н.Л., Иванкин А.Н., Зенкин А.Н. Биохимическая конверсия природных липидов. Обзор. Теория и практика переработки мяса. 2018;3(3): 12–26. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-12-26

FOR CITATION: Baburina M.I., Vostrikova N.L., Ivankin A.N., Zenkin A.N. Biochemical conversion of natural lipids. A review. Theory and practice of meat processing. 2018;3(3): 12–26. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-12-26

и являются источником пластического материала для тканей организма. Отдельные компоненты жира — некоторые жирные кислоты, фосфатиды, стеролы, жирорастворимые витамины — выполняют важные биологические функции в организме [12,13].

По современным представлениям науки о питании, несмотря на определенные противоречивости используемых критериев, представляется, что здоровый организм человека должен потреблять в составе липидов 10–20 % полиненасыщенных (ПНЖК), 50–60 %

мононенасыщенных (МНЖК) и 30 % насыщенных (НЖК) C_{10-18} жирных кислот. Такое сбалансированное питание реализуется в рационе, содержащем 1/3 растительных и 2/3 животных жиров. Для людей пожилого возраста содержание линолевой кислоты должно составлять около 40 % и линоленовой — 4 %, соотношение полиненасыщенных (ПНЖК) и насыщенных (НЖК) кислот — 2:1 [3,10,14]. Типичный жирнокислотный состав липидов животного происхождения представлен в Табл. 1 [10,15].

Таблица 1. Содержание основных жирных кислот, % к сумме жирных кислот

Наименования базовых жирных кислот	Жиры животного происхождения				
	Говяжий	Свиной	Бараний	Куриный	Молочный
Σ жирных кислот	94,5	96,3	94,5	95,8	97,2
Насыщенные (НЖК), в т.ч.:	46,7	42,8	45,9	36,9	61,0 (50–70)*
$C_{4:0}$ (масляная, бутановая)	0,01–0,1	0,01–0,1	0,01–0,1	0,01–0,1	2,9 (2,0–4,3)
$C_{6:0}$ (капроновая, гексановая)	0,01–0,1	0,01–0,1	0,01–0,1	0,01–0,1	2,3 (1,5–3,5)
$C_{8:0}$ (каприловая, октановая)	0,01–0,1	0,01–0,2	0,01–0,2	0,01–0,2	1,1 (1,0–2,5)
$C_{10:0}$ (каприновая, декановая)	0,1	0,14	0,18 (0,1–0,3)	0,01–0,1	2,4 (2,0–3,8)
$C_{12:0}$ (лауриновая, додекановая)	0,9	0,2	0,3 (0,2–0,5)	0,3	2,7 (2,0–4,0)
$C_{14:0}$ (миристиновая, тетрадекановая)	3,2 (3,0–3,4)	1,5 (0,8–1,4)	2,2 (2,2–3,2)	1,3 (0,8–1,7)	12,4 (8,0–12,0)
$C_{15:0}$ (пентадекановая, пентадециловая)	0,1	0,06	0,4	0,3	4,7 (4,0–6,5)
$C_{16:0}$ (пальмитиновая, гексадекановая)	25,5 (24–29)	25,1 (27–30)	22,5 (23–30)	22,1 (20–26)	15,3 (15,0–31,0)
$C_{17:0}$ (маргариновая, гептадекановая)	0,5	0,25	1,2 (1–2)	<0,5	4,4 (3,5–6,5)
$C_{18:0}$ (стеариновая, октадекановая)	15,5 (20–24)	13,3 (13–18)	17,2 (17–31)	8,5 (4–9)	6,0 (6,0–13,0)
$C_{19:0}$ (нондекановая)	0,8	1,0	1,2	0,1	4,0 (2,0–6,0)
$C_{20:0}$ (арахиновая, эйкозановая)	0,2	0,3 (0,1–0,4)	0,2 (0,1–1,6)	3,2	1,1 (0,3–1,5)
$C_{22:0}$ (бегеновая, доэйкозановая)	0,3	0,55	0,3	0,3	1,7 (0,1–2,0)
Мононенасыщенные (МНЖК), в т.ч.:	41,1	41,9	41,7	46,4	26,9 (25–45)
$C_{14:1}$ (миристолеиновая, цис-9-тетрадеценивая)	0,3	0,08	0,4	0,7	1,5 (0,5–1,5)
$C_{15:1}$ цис-10-пентадеценивая	0,1	0,3	0,6	0,7	0,7 (0,1–1,0)
$C_{16:1}$ (пальмитолеиновая, цис-9-гексадеценивая)	3,0 (2,1–3,0)	2,32 (1,7–2,5)	2,9 (6–12)	5,1 (3–9)	2,6 (0,5–3,5)
$C_{17:1}$ цис-10-гептадеценивая	1,1	1,2	0,8 (0,5–2)	1,2	0,5 (0,1–1,5)
$C_{18:1}$ п9с (олеиновая, цис-9-октадеценивая)	32,7 (30–42)	34 (30–44)	32,9 (32–41)	36,9 (30–45)	21,1 (20,0–32,5)
$C_{18:1}$ п9т элаидиновая (транс-9-октадеценивая)	3,2	2,7	3,5	1,4	0,2
$C_{20:1}$ цис-11-эйкозеновая	0,4	0,5 (0,5–1,5)	0,2	0,3	0,2
$C_{22:1}$ п9 (эруковая, цис-13-докозеновая)	0,3	0,8	0,4	0,1	0,1
Полиненасыщенные (ПНЖК), в т.ч.:	6,7	11,6	6,9	12,5	9,3
$C_{18:2}$ п6с (линолевая, цис-9,12-октадекадиеновая) ω6	3,8 (2–5)	7,8 (7–9)	3,9 (3–7)	9,3 (9–20)	3,4 (3,0–5,5)
$C_{18:3}$ п6 (γ-линоленовая, цис-6,9,12-октадекатриеновая) ω6	0,4	0,8 (0,5–2,0)	0,4	0,6	1,4 (0,1–2,0)
$C_{18:3}$ п3 (α-линоленовая, цис-9,12,15-октадекатриеновая) ω3	0,3	0,6 (0,5–1,5)	0,5 (0,5–1,6)	0,5	0,8 (0,1–1,5)
$C_{20:2}$ цис-11,14-эйкозадиеновая	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3
$C_{20:3}$ п6 цис-8,11,14-эйкозатриеновая, ω6	0,2	0,4	0,1 (0,1–0,3)	0,1	0,2
$C_{20:4}$ (арахидоновая, цис-9,12,15-октадекатриеновая) ω6	1,6	1,2 (0,5–2,0)	1,5 (1–4)	0,4	2,5 (0,1–4,0)
$C_{22:2}$ цис-13,16,17-докозадиеновая	0,2	0,4	0,1	0,3	0,5
$C_{22:6}$ (цервоновая, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая) ω3	0,1	0,2	0,3 (0,1–0,4)	1,2	0,2 (0,1–1,5)

* — в скобках указаны наиболее часто встречающиеся значения содержания жирных кислот

Из данных Табл. 1 видно, что природные липиды содержат достаточно обширный набор жирных кислот, однако основными составляющими являются пальмитиновая, стеариновая и олеиновая жирные кислоты, которые могут в сумме составлять более 2/3 всех имеющихся кислот. Биологическая (пищевая) ценность жиров и масел может оцениваться с учетом данных Табл. 2.

Из данных Табл. 2 видно, что наиболее ценные ПНЖК содержатся в значительных количествах в растительных маслах, а по соотношениям жирных кислот следует отметить липиды морепродуктов, свиной жир, а также льняное масло.

На пищевые цели используются практически все жиры и масла, кроме рапсового, состав жирных кислот которого, наиболее неблагоприятный для питания человека. Рапсовое масло применяют в основном на технические цели для переработки в биодизель [15,16].

Потребление жиров в процессе питания заключается в их биохимической трансформации в пищеварительных системах. Внутренние ферменты живых организмов осуществляют энзиматическое расщепление жиров, а высвобождающиеся жирные кислоты используются в качестве «конструкционных элементов» для построения необходимых организму биоструктур [17,18,19].

В процессе такого усвоения липидов участвует множество ферментов, в частности пепсин и трипсин [3,18].

В органах тканей человека, животных и микроорганизмов имеются также важнейшие ферменты — липазы (по классификации КФ 3.1.1.3), которые расщепляют липиды и регулируют их распределение при обмене веществ.

Использование природных механизмов дает возможность корректировать биологическую ценность жиров путем их переэтерификации и образования

новых липидных продуктов с улучшенным жирнокислотным составом [20,21,22,23].

Для этих целей можно использовать, например, говяжий жир, не обладающий оптимальным жирнокислотным составом. При осуществлении процесса переэтерификации в присутствии ферментов, обычно используют животный жир с низким содержанием свободных жирных кислот (КЧ менее 4 мгКОН/г). Как указывалось выше, в составе природных липидов, жирные кислоты находятся в связанном состоянии в виде триглицеридов. Под воздействием внутренних ферментов и других факторов в нативном состоянии, а также при хранении некоторая часть жирных кислот высвобождается и находится в жировой ткани в свободном состоянии. Их количество устанавливают путем кислотно-основного титрования, путем определения значения кислотного числа КЧ, выраженное в мгКОН/г [5,24,25]. По нормативным требованиям пищевые жиры не должны по величине КЧ превышать значения более 4 мгКОН/г жира.

В качестве ферментных препаратов с липазной активностью можно использовать фармакопейный ферментный препарат марки ЛИПАЗИН®, полученный во ВНИИМП им. В.М. Горбатова, представляющий собой полипептидную фракцию, выделенную фракционированием в присутствии сульфата аммония с последующим диализом и лиофилизацией из поджелудочной железы свиней и обладающей липолитической активностью более 4000 ед/мг (1 ед. активности соответствует количеству фермента, высвобождающего 1 мкмоль жирных кислот из 40 %-ной эмульсии оливкового масла, стабилизированной в присутствии 0,5 %-ного поливинилового спирта при 37 °С в трис-буфере с рН 9,0) [26,27,28].

Для аналитических целей возможно использование панкреатической липазы производства Serva (Германия) молекулярной массой 50 кДа, удельной активно-

Таблица 2. Показатели биологической эффективности жиров и масел

Наименование	Соотношение				
	МНЖК: ПНЖК: НЖК	ПНЖК: НЖК	$C_{18:2}: C_{18:1}$	$C_{18:2}: C_{18:3}$	$\omega 6: \omega 3$
Идеальный жир	1:1:1	0,2–0,4	>0,25	>0,7	4:1
Говяжий жир	1:0,15:1,1	0,15	0,12	9,5	15:1
Свиной жир	1:0,28:1,02	0,27	0,2	9,7	12:1
Бараний жир	1:0,16:1,1	0,15	0,12	9,75	7:1
Куриный жир	1:0,27:0,8	0,3	0,25	15,5	6:1
Жир молока коровьего	1:0,35:2,25	0,15	0,16	2,4	7:1
Тюлений жир лахтака	1:0,28:0,5	0,5	0,12	1,7	1:3
Нерпы — акибы	1:0,24:0,45	0,52	0,08	1,7	1:4
Рыбий жир анчоуса	1:0,3:0,5	0,57	0,05	1,5	1:3
Подсолнечное	1:1,4:0,3	4,5	1,4	250	500:1
Соевое	1:2,7:0,6	4,7	2,4	7,3	35:1
Какао	1:0,3:7	0,05	0,03	8	5:1
Рапсовое	1:0,05:0,1	2,6	0,2	1,5	10:1
Льняное	1:2,0:0,6	3,0	0,75	0,6	85:1
Оливковое	1:0,1:0,4	0,26	0,08	5	9:1

стью 13 ед/мг (здесь 1 ед. активности соответствует количеству фермента, высвобождающего 1 мкмоль/мин олеиновой кислоты из 50 %-ной эмульсии оливкового масла, стабилизированной в присутствии 8 мг/мл таурохолат натрия при 37 °С в трис/NaCl — буфере с pH 9,2), а также консервированную в присутствии 2,5 % этанола водную (2:3) суспензию поджелудочной железы свиней. Вместо суспензии нативной поджелудочной железы возможно также использование препарата ПАНКРЕАТИН® с протеолитической активностью 300 ед/г, который представляет собой очищенную и высушенную поджелудочную железу свиней [29,30,31].

На Рис. 1 показана зависимость изменения КЧ от времени под воздействием панкреатина и других ферментов. Характер зависимости подтверждает наличие липолитической активности по отношению к используемому говяжьему жиру. Панкреатин, как известно, обладает полиферментным действием, а сама поджелудочная железа оказывает расщепляющее действие практически на все биополимерные структуры, включая белки, углеводы и липиды [30].

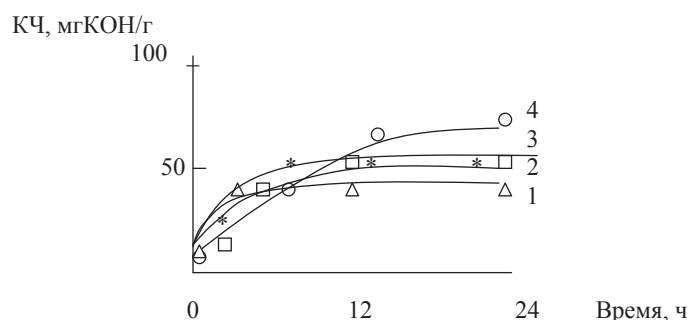


Рис. 1. Зависимость изменения кислотного числа системы при ферментативном гидролизе 10 %-ной эмульсии говяжьего жира от времени обработки при 50 °С, pH 8,0 и соотношении фермент: субстрат 1:8 в присутствии: 1 — липазина, 2 — липазы Serva, 3 — панкреатина, 4 — суспензии поджелудочной железы

Интересно отметить, что как следует из данных ферментативного расщепления животного жира, приведенных на Рис. 1, процесс в описанных условиях *in vitro* заканчивается практически в пределах 3–6 часов, что примерно соответствует длительности процесса пищеварения млекопитающих *in vivo*.

Оптимальными условиями для биохимической конверсии липидов *in vitro* в присутствии ферментов можно считать следующие: 10–50 % эмульсия типа вода/масло любого природного жира или масла в водной или водно-солевой среде, концентрация примесных солей до 0,1 М, pH 8,0–8,5, температура 50–60 °С, фермент: субстратное соотношение, зависящее от удельной липазной активности применяемого ферментного препарата 1:5–1:10 [30,32]. В этих условиях возможно достижение высоких значений конверсии липидов.

Процесс биохимической конверсии липидов под воздействием ферментов происходит как многостадийный и протекает по механизму обратимой биохимической реакции.

Сперва, у триглицерида происходит отщепление одной жирной кислоты с образованием диглицерида, затем происходит отщепление еще одной жирной кислоты с образованием моноглицерида. И наконец, может происходить отщепление третьего, последнего жирнокислотного остатка с образованием чистого глицерина и свободных жирных кислот. Все реакции на всех этапах являются обратимыми, то есть высвобождение остатка жирной кислоты параллельно может сопровождаться присоединением другой жирной кислоты. На практике, из-за такого сложного механизма, степень превращений обычно не превышает 50 %. Для решения задачи повышения выхода в этом случае, необходимо использовать специальные приемы смещения химического равновесия по принципу Ле Шателье, например, путем удаления продуктов из реакционной среды.

Возможность протекания обратимой реакции целесообразно использовать для модификации природных жиров с неоптимальным жирнокислотным составом.

Так, для получения, например, специальных липидных функциональных продуктов, целесообразно проведение совместной ферментативной обработки смеси достаточно дорогостоящих животных жиров, например говяжьего жира, с достаточно дешевыми видами растительных масел, например, подсолнечным, что может приводить к получению липидного продукта с более благоприятным составом жирных кислот [24, 33].

Проведенная оценка состава фракции жирных кислот высвобожденных из говяжьего жира в результате обработки липазами показывает, что в раствор преимущественно высвободились насыщенные жирные кислоты, в частности около 40 % пальмитиновой и стеариновой кислот. Изменение содержания ненасыщенных жирных кислот под воздействием ферментов оказалось менее значимым, в частности высвободилось только 15 % содержащейся олеиновой кислоты.

Таким образом, применение животных липаз может быть достаточно перспективным для модификации жирнокислотного состава низкосортных жиров с последующим его приведением к оптимальному, например, за счет переэтерификации [21,25].

Гидролитический распад природных липидов в круговороте пищи является важнейшим путем реализации общего значения и роли жиров и масел как накопителей энергии в клетках живых системах. Существует возможность непосредственного использования особенностей химического строения липидов для получения важных технических продуктов — жидкого моторного топлива из возобновляемого сырья, каковыми и являются все природные липиды.

Из литературных данных известно, что природные липиды, содержащиеся в сельскохозяйственном сырье, могут быть полностью трансформированы в свободные жирные кислоты в присутствии кислотно-

основных катализаторов, которые затем превращают в метиловые эфиры для последующего сжигания в технических устройствах. Этот процесс, также как и ферментативная обработка, протекает с недостаточным выходом из-за многостадийности и ингибирующего влияния примесей воды и биополимеров, содержащихся в жировом сырье [34,35].

Большое количество отходов животного происхождения на мясоперерабатывающих предприятиях позволяет рассматривать отходы животных жиров в качестве перспективного сырья для получения высокоэнергоемких продуктов, которые могут быть использованы как в качестве добавок к минеральным видам топлива, так и самостоятельно в качестве эффективного топлива, например, для малых энергетических установок и сжигания в мини котельных [36].

Исследователи пришли к выводу, что растительные масла, также как и отходы переработки животных жиров, имеют перспективу использования в качестве альтернативных видов топлива для дизельных двигателей. Использование сырого растительного масла может привести к техническим проблемам, связанным с работой двигателей. Повышенная вязкость и низкая летучесть растительных масел приводит к большим отложениям, закоксовыванию инжектора и залипанию поршневого кольца. Эти нежелательные эффекты могут быть снижены или устранены в результате этерификации жиров и масел с образованием моноалкиловых эфиров, смесь которых и носит название *биодизельного* топлива [37,38,39,40].

Биотрансформация липидного сырья обеспечивает вязкость топлива, близкую к вязкости обычного дизельного топлива. Биодизельное топливо привлекает повышенное внимание как альтернативное, нетоксичное, обладающее способностью к биоразложению и является возобновляемым. Его свойства имеют некоторые отличия в зависимости от вида сырья и используемого спирта, однако, оно всегда может быть использовано в качестве непосредственного заменителя дизельного топлива из продуктов нефтепереработки [41].

Несмотря на свои привлекательные свойства, биодизельное топливо из пищевых растительных масел и животных жиров по своим экономическим показателям пока не может конкурировать с дизельным топливом из нефти. Однако, сегодня имеются большие количества масел и животных жиров низкой стоимости, например, жировые отходы из ресторанов, предприятий общественного питания и пищевых производств, которые могут быть преобразованы в биодизельное топливо. Основной проблемой переработки таких масел и жиров является то, что в них содержится много свободных жирных кислот, которые не могут быть просто трансформированы в биодизельное топливо с использованием традиционного щелочного катализатора на основе КОН [36].

В мясной отрасли известен процесс нейтрализации животных жиров с целью понижения кислотного числа, осуществляемый добавлением раствора каустической или кальцинированной соды с образованием мыла, что вызывает значительные потери исходного сырья [5]. Обработка серной кислотой позволяет исключать эти потери и получать моноалкиловые эфиры благодаря конверсии свободных жирных кислот. В качестве перерабатываемого сырья возможно использование топленого технического жира (ТТЖ), содержащего 5, 20 и 40 % свободных жирных кислот (СЖК) и около 0,2 % воды. Для этерификации возможно использование метилового спирта (99,9 %) или абсолютированного этилового спирта (99,5 %) в присутствии концентрированной серной кислоты. Жирно-кислотный состав образцов трех видов липидного сырья с различным содержанием СЖК представлен в Табл. 3.

Таблица 3. Основной жирнокислотный состав липидного сырья с высоким содержанием свободных жирных кислот

Жирная к-та	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	Сумма насыщенных жирных кислот, %
ТТЖ с 5 % СЖК	1,7	17,3	1,9	15,6	42,5	9,2	0,4	34,6
ТТЖ с 20 % СЖК	2,4	23,2	3,8	13,0	44,3	7,0	0,7	38,6
ТТЖ с 40 % СЖК	1,7	22,8	3,1	12,5	42,4	12,1	0,8	37,0

Исследования показывают [38,39], что оптимальный предел содержания СЖК в исходном жировом сырье должен быть не выше 1 мг КОН/г (0,5 % свободных жирных кислот), т.к. при более высоком содержании, СЖК активно взаимодействуют со щелочным катализатором, вызывая неэффективные потери из-за параллельного образования мыла по реакции: СЖК + КОН = калиевая соль жирных кислот (мыло) + вода. Следует отметить, что при использовании животного жирового сырья склонность к образованию эмульсий более высокая по сравнению с растительным сырьем. Повышение концентрации щелочного катализатора, затрачиваемое на нейтрализацию СЖК, вызывает появление трудно разрушаемой эмульсии.

Кислотные катализаторы, действуют слишком медленно, обеспечивая низкую конверсию для того, чтобы их было целесообразно использовать в процессе преобразования триглицеридов животных и растительных жиров в биодизельное топливо, т.к. при этом требуется большой, до 20:1 избыток спирта и продолжительное, до 5–10 ч время реакции (Рис. 2).

Однако кислотные катализаторы являются достаточно эффективными для преобразования свободных жирных кислот в эфиры, вследствие чего их применение является технически целесообразным.

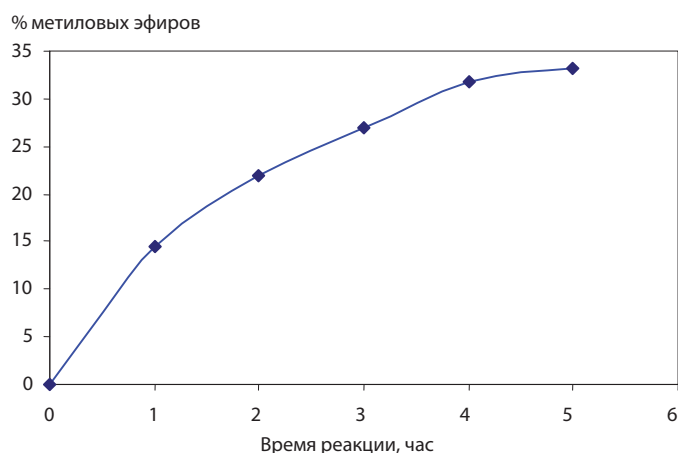


Рис. 2. Переработка животного жира с 20 % СЖК в присутствии метилового спирта в молярном соотношении 20:1 и 5 % концентрированной серной кислоты при 65 °С

Сернокислотная обработка позволяет снизить значение кислотного числа жировой смеси до уровня существенно меньшего 2 мг КОН/г, что в дальнейшем может повышать эффективность действия щелочного катализатора. Это связано с развитием реакции этерификации свободных жирных кислот: СЖК + метанол = метиловые эфиры жирных кислот (биодизель) + вода, которая достаточно эффективно протекает в присутствии 5–10 % концентрации серной кислоты.

Молярное соотношение одноатомного алифатического спирта к жировому сырью — один из важнейших факторов, влияющих на скорость реакции. Использование более низкого молярного соотношения спирта и жира, менее 6:1, не позволяет снизить значения кислотного числа до требуемых значений. Для бо-

лее высокой скорости конверсии СЖК в эфиры можно повысить молярное соотношение спирта от 10:1 до 30:1 в зависимости от типа спирта, но данный способ не является экономичным. Оптимальное молярное соотношение 9:1.

Влияние количества катализатора на значение кислотного числа в течение 90 мин опыта показано в Табл. 4 для молярного отношения метанола к жировому сырью равного 9:1. Как можно видеть, при нулевом количестве катализатора кислотное число достигало оптимальных результатов в конце опыта только при переработке жира с 5 % СЖК. Однако, в присутствии катализатора происходит быстрое снижение кислотного числа, которое наблюдалось сразу же после добавления раствора метанола и серной кислоты к жировому сырью с высоким содержанием СЖК. Кислотное число для сырья с 20 % СЖК может снижаться от 41 до 0,56 мг КОН/г за 90 мин при 5 % концентрации кислотного катализатора и до 0,7 мг КОН/г за 60 мин при 15 % кислотного катализатора. Для сырья с 40 % СЖК кислотное число может снижаться с 90 до значения 15 мг КОН/г за 90 мин при 5 % кислотного катализатора. Когда используется 15 % H_2SO_4 , то кислотное число может быстро достигать целевого значения в 1,0 мг КОН/г.

Тип применяемого спирта влияет на результаты этерификации жирных кислот, поскольку замена токсичного метанола на относительно безопасный этанол является весьма желательным для практического использования (Табл. 5). Более быстрое понижение кислотного числа в этаноле может быть связано с более

Таблица 4. Влияние количества катализатора и времени проведения реакции на снижение кислотного числа с использованием метанола (соотношение метанол: жир 9:1)

Время реакции, мин	5 % СЖК, мг/КОН/г			20 % СЖК, мг/КОН/г			40 % СЖК, мг/КОН/г	
	0 % H_2SO_4	5 % H_2SO_4	15 % H_2SO_4	0 % H_2SO_4	5 % H_2SO_4	15 % H_2SO_4	5 % H_2SO_4	15 % H_2SO_4
0	11,30	11,30	11,30	41,28	41,28	41,28	91,20	91,20
1	9,04	3,54	3,42	39,05	15,93	15,85	28,33	21,76
15	6,88	0,93	0,68	38,00	11,40	5,76	25,00	18,06
30	4,97	—	—	36,20	8,30	3,53	20,43	15,63
45	3,02	—	—	34,07	3,98	1,50	19,22	11,12
60	1,50	—	—	33,15	1,77	0,70	18,30	7,15
75	0,83	—	—	32,35	1,24	—	17,09	3,76
90	—	—	—	30,87	0,56	—	15,68	1,02

Таблица 5. Влияние количества катализатора и времени проведения реакции на снижение кислотного числа с использованием этанола (соотношение этанол: жир 9:1)

Время реакции, мин	5 % СЖК		20 % СЖК		40 % СЖК	
	5 % H_2SO_4	15 % H_2SO_4	5 % H_2SO_4	15 % H_2SO_4	5 % H_2SO_4	15 % H_2SO_4
0	11,30	11,30	41,28	41,28	91,20	91,20
1	3,29	3,04	8,64	8,03	12,35	10,22
15	0,74	0,51	7,01	5,02	11,85	8,45
30	—	—	5,62	2,94	10,00	6,57
45	—	—	4,23	0,72	9,04	5,05
60	—	—	3,06	—	8,12	4,43
75	—	—	1,00	—	7,40	2,34
90	—	—	—	—	7,09	0,62

высокой температурой реакции и более высокой растворимостью этанола в жирах и эфирах. Конечные значения кислотного числа для этанола, реагирующего с ТТЖ, содержащего 40 % СЖК, обычно ниже, чем для метанола.

Для полноты конверсии СЖК, полученных из животных липидов необходимо использовать многоступенчатый процесс. По завершении каждой стадии, длительностью в 0,5 ч, реакционную смесь необходимо отстаивать в течение 0,5–2 ч и удалять фракцию спирта с водой. Процесс требует трех-четырех кратного повторения. Для жирового сырья с 5 % СЖК достаточно одноступенчатого процесса длительностью в 15 мин с 5 % кислотного катализатора. Для жирового сырья с 20 % СЖК наиболее оптимальным являются 2-х ступенчатая этерификация длительностью по 30 мин с 15 % кислотного катализатора или 3-х ступенчатая этерификация по 30 мин с 5 % кислотным катализатором. Для жирового сырья с 40 % СЖК наиболее оптимальным являются 3-х ступенчатая этерификация длительностью по 30 мин с 15 % кислотного катализатора, снижающая до нужного уровня СЖК для дальнейшей переработки [42].

После того как кислотное число для ТТЖ с высоким содержанием свободных жирных кислот уменьшается до значения менее 2 мг КОН/г в ходе многоступенчатой обработки, возможно продолжение процесса в присутствии 1 % щелочи с использованием метанола или этанола при молярном соотношении 6:1 при температуре близкой, к точке кипения спиртов при атмосферном давлении. Выхода процесса показаны в Табл. 6.

Таблица 6. Выход моноалкиловых эфиров, полученных из жирового сырья с высоким содержанием свободных жирных кислот

Сырье	Выход %
<i>Этанол</i>	
5 % СЖК	93
15 % СЖК	77
40 % СЖК	60
<i>Метанол</i>	
5 % СЖК	95
15 % СЖК	80
40 % СЖК	65

Применение различных спиртов в комбинации с использованием отходов липидного сырья различного происхождения позволяет трансформировать данный вид возобновляемого сырья в продукты технического назначения. Происхождение сырья на про-

текание механизма биохимической трансформации практической роли не играет, поскольку варьирование условий ведения процесса позволяет получать приемлемые результаты. В алкиловые эфиры могут быть преобразованы смеси жирных кислот, выделенных как из растительных объектов, так и животного и рыбного происхождения. Оптимальными условиями 3-х...4-х стадийных превращений являются: температура 65–75 °С, концентрация серной кислоты 1–5 % к массе сырья, соотношение спирта к сырью от 5:1 до 20:1, длительность одной стадии 0,5–2 ч. Указанные параметры позволяют получать биотопливо из природных липидов с достаточно высоким выходом.

Выводы

Таким образом, краткое рассмотрение вопросов химической и биохимической трансформации природных липидов показывает, что существует возможность осуществления данных процессов либо путем копирования естественных условий живых систем *in vivo* путем проведения энзиматической переработки *in vitro*, либо путем осуществления глубоких превращений липидов по законам классической органической химии.

Переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработка и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных, хранение и эффективная переработка сельскохозяйственной продукции, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания — в настоящее время является одним из первоочередных аспектов определенных в Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации. Вследствие чего, обзор условий осуществления процесса биохимической конверсии природных липидов в присутствии ферментов показывает, что существует возможность управляемой трансэтерификации жиров, что позволяет на практике реализовывать идею биокоррекции химического состава липидов с целью дальнейшего получения продуктов с полностью сбалансированным жирнокислотным составом, которым не обладают большинство используемых жиров и масел. Такие продукты могут использоваться как функциональные, лечебно-профилактического действия.

Глубокая переработка жиров и масел путем полного расщепления, позволяет получать технические продукты с возможностью их использования в топливных системах.

Main part

Natural lipids are the most important components of agricultural production, which are widely used for technical purpose and in foods largely determining nutritional and biological value and taste [1]. Most of such

lipids are represented by animal, fish, and vegetable oils and fats [2,3,4].

All naturally occurring lipids for 96–98 % are a mixture of triglycerides with chemical composition of $\text{ROCH}_2\text{CH}(\text{OR})\text{CH}_2\text{OR}$, where R is aliphatic fatty acid

residue. The variety of fatty acids in lipids determines the nutritional value, i.e. the “quality of fat” [5,6]. Chemically, triglycerides of natural lipids are glycerol esterified with R-residues of C6–C24 fatty acids [7, 8]. Most natural lipids are used for eating in a variety of food products.

The chemical composition of animal and vegetable fats and oils is very important for the characterization of nutritional value taking into account high digestibility. For pork fat, digestibility is usually 96 to 98 %, for vegetable oils — 95 to 99 %, for butter — 93 to 99 %, while for beef it is 80 to 94 % and for lamb fat — 80 to 90 % [9,10,11].

Lipids are important ingredients in human food, as they have high energy value and are a source of plastic material for body tissues. Individual components of fat, i.e. some

fatty acids, phosphatides, sterols, fat-soluble vitamins, have important biological functions in the body [12,13].

According to modern knowledge in nutrition, but taking into account some contradictions in the criteria used, it seems that a healthy human should consume 10 to 20 % of polyunsaturated (PUFA), 50 to 60 % of monounsaturated (MUFA) and 30 % of saturated (SFA) C10–18 fatty acids. Such a balanced nutrition is realized in a diet containing 1/3 of vegetable oils and 2/3 of animal fats. For elderly people, linoleic acid content should be about 40 % and linolenic acid — about 4 %; the ratio of polyunsaturated (PUFA) and saturated (SFA) acids should be 2:1 [3, 10,14]. A typical fatty acid composition of animal lipids is presented in Table 1 [10,15].

Table 1. Content of basic fatty acids,% of total fatty acids

Basic fatty acids	Fats of animal origin				
	Beef	Pork	Lamb	Chicken	Butter
Σ of fatty acids	94.5	96.3	94.5	95.8	97.2
Saturated (SFA), including:	46.7	42.8	45.9	36.9	61.0 (50–70)*
C _{4:0} (butyric acid, butanoic acid)	0.01–0.1	0.01–0.1	0.01–0.1	0.01–0.1	2.9 (2.0–4.3)
C _{6:0} (caproic acid, hexanoic acid)	0.01–0.1	0.01–0.1	0.01–0.1	0.01–0.1	2.3 (1.5–3.5)
C _{8:0} (caprylic acid, octanoic acid)	0.01–0.1	0.01–0.2	0.01–0.2	0.01–0.2	1.1(1.0–2.5)
C _{10:0} (capric acid, decanoic acid)	0.1	0.14	0.18 (0.1–0.3)	0.01–0.1	2.4 (2.0–3.8)
C _{12:0} (lauric acid, dodecanoic acid)	0.9	0.2	0.3 (0.2–0.5)	0.3	2.7 (2.0–4.0)
C _{14:0} (myristic acid, tetradecanoic acid)	3.2 (3.0–3.4)	1.5 (0.8–1.4)	2.2 (2.2–3.2)	1.3 (0.8–1.7)	12.4 (8.0–12.0)
C _{15:0} (pentadecanoic acid, pentadecylic acid)	0.1	0.06	0.4	0.3	4.7 (4.0–6.5)
C _{16:0} (palmitic acid, hexadecanoic acid)	25.5 (24–29)	25.1 (27–30)	22.5 (23–30)	22.1 (20–26)	15.3 (15.0–31.0)
C _{17:0} (margaric acid, heptadecanoic acid)	0.5	0.25	1.2 (1–2)	<0.5	4.4 (3.5–6.5)
C _{18:0} (stearic acid, octadecanoic acid)	15.5 (20–24)	13.3 (13–18)	17.2 (17–31)	8.5 (4–9)	6.0 (6.0–13.0)
C _{19:0} (non-decanoic acid)	0.8	1.0	1.2	0.1	4.0 (2.0–6.0)
C _{20:0} (arachinic acid, eicosanoic acid)	0.2	0.3(0.1–0.4)	0.2 (0.1–1.6)	3.2	1.1(0.3–1.5)
C _{22:0} (behenic acid, docosanoic acid)	0.3	0.55	0.3	0.3	1.7(0.1–2.0)
Monounsaturated (MUFA), including:	41.1	41.9	41.7	46.4	26.9 (25–45)
C _{14:1} (myristoleic acid, cis-9-tetradecenoic acid)	0.3	0.08	0.4	0.7	1.5 (0.5–1.5)
C _{15:1} (cis-10-pentadecenoic acid)	0.1	0.3	0.6	0.7	0.7 (0.1–1.0)
C _{16:1} (palmitoleic acid, cis-9-hexadecenoic acid)	3.0 (2.1–3.0)	2.32 (1.7–2.5)	2.9 (6–12)	5.1 (3–9)	2.6 (0.5–3.5)
C _{17:1} (cis-10-heptadecenoic acid)	1.1	1.2	0.8 (0.5–2)	1.2	0.5 (0.1–1.5)
C _{18:1} n9c (oleic acid, cis-9-octadecenoic acid)	32.7 (30–42)	34 (30–44)	32.9 (32–41)	36.9 (30–45)	21.1 (20.0–32.5)
C18:1n9t (elaidic acid, trans-9-octadecenoic acid)	3.2	2.7	3.5	1.4	0.2
C _{20:1} (cis-11-eicosenoic acid)	0.4	0.5 (0.5–1.5)	0.2	0.3	0.2
C _{22:1} n9 (erucic acid, cis-13-docosenoic acid)	0.3	0.8	0.4	0.1	0.1
Polyunsaturated (PUFA), including:	6.7	11.6	6.9	12.5	9.3
C _{18:2} n6c (linoleic acid, cis-9,12-octadecadienoic acid) ω 6	3.8 (2–5)	7.8 (7–9)	3.9 (3–7)	9.3 (9–20)	3.4 (3.0–5.5)
C _{18:3} n6 (γ -linolenic acid, cis-6,9,12-octadecatrienoic acid) ω 6	0.4	0.8 (0.5–2.0)	0.4	0.6	1.4 (0.1–2.0)
C _{18:3} n3 (α -linolenic acid, cis-9,12,15-octadecatrienoic acid) ω 3	0.3	0.6 (0.5–1.5)	0.5 (0.5–1.6)	0.5	0.8(0.1–1.5)
C _{20:2} (cis-11,14-eicosadienoic acid)	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3
C _{20:3} n6 (cis-8,11,14-eicosatrienoic acid) ω 6	0.2	0.4	0.1 (0.1–0.3)	0.1	0.2
C _{20:4} (arachidonic acid, cis-9,12,15-octadecatrienoic acid) ω 6	1.6	1.2 (0.5–2.0)	1.5 (1–4)	0.4	2.5(0.1–4.0)
C _{22:2} (cis-13,16,17-dokosadienoic acid)	0.2	0.4	0.1	0.3	0.5
C _{22:6} (cervonic acid, cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid) ω 3	0.1	0.2	0.3 (0.1–0.4)	1.2	0.2 (0.1–1.5)

* – the most frequent values of fatty acid content are indicated in brackets

Table 2. Indicators of biological efficacy of fats and oils

Item	Ratio				
	MUFA : PUFA : SFA	PUFA : SFA	C _{18:2} : C _{18:1}	C _{18:2} : C _{18:3}	ω 6 : ω 3
Ideal fat	1 : 1 : 1	0.2–0.4	>0.25	>0.7	4 : 1
Beef fat	1 : 0.15 : 1.1	0.15	0.12	9.5	15 : 1
Pork fat	1 : 0.28 : 1.02	0.27	0.2	9.7	12 : 1
Lamb fat	1 : 0.16 : 1.1	0.15	0.12	9.75	7 : 1
Chicken fat	1 : 0.27 : 0.8	0.3	0.25	15.5	6 : 1
Butter	1 : 0.35 : 2.25	0.15	0.16	2.4	7 : 1
Bearded seal fat	1 : 0.28 : 0.5	0.5	0.12	1.7	1 : 3
Ringed seal fat	1 : 0.24 : 0.45	0.52	0.08	1.7	1 : 4
Anchovy oil	1 : 0.3 : 0.5	0.57	0.05	1.5	1 : 3
Sunflower oil	1 : 1.4 : 0.3	4.5	1.4	250	500 : 1
Soybean oil	1 : 2.7 : 0.6	4.7	2.4	7.3	35 : 1
Cocoa oil	1 : 0.3 : 7	0.05	0.03	8	5 : 1
Rapeseed oil	1 : 0.05 : 0.1	2.6	0.2	1.5	10 : 1
Linseed oil	1 : 2.0 : 0.6	3.0	0.75	0.6	85 : 1
Olive oil	1 : 0.1 : 0.4	0.26	0.08	5	9 : 1

From the data in Table 1, natural lipids contain a wide range of fatty acids, but the main constituents are palmitic, stearic and oleic fatty acids that comprise together up to 2/3 of all the acids present. The biological (nutritional) value of fats and oils can be estimated taking into account the data in Table 2.

From the data in Table 2, the significant amounts of the most valuable PUFAs are contained in vegetable oils, and the most optimal ratios of fatty acids are in lipids of seafood, pork fat, and linseed oil.

Almost all fats and oils are used in foods, except for rapeseed oil, whose fatty acid composition is the most unfavorable for human nutrition. Rapeseed oil is used mainly for technical purposes for processing into biodiesel [15,16].

Consumption of fats in nutrition supposes their biochemical transformation in the digestive tract. Internal enzymes of living organisms carry out enzymatic degradation of fats, and released fatty acids are used as “structural elements” for building biostructures necessary for the organism [17,18,19].

A lot of enzymes are involved in the process of lipid uptake, in particular pepsin and trypsin [3,18].

In the tissues of humans, animals and microorganisms, there are also important enzymes, lipases (EC number 3.1.1.3), breaking down the lipids and regulating their distribution during metabolism.

The use of natural mechanisms makes it possible to regulate the biological value of fats by their transesterification and the formation of new lipid products with improved fatty acid composition [20,21,22,23].

For these purposes, for example, beef fat may be used, which does not have the optimal fatty acid composition. When performing the transesterification process in the presence of enzymes, animal fat with a low content of free fatty acids (acid value less than 4 mg KOH/g) is usually

used. As mentioned above, in the composition of natural lipids, fatty acids are bound to triglycerides. Under the influence of internal enzymes and other factors, in the native state and during storage, some of the fatty acids are released and remain in a free state in the adipose tissue. Their amount is evaluated with acid-base titration by determining the acid value expressed in mg KOH/g [5,24,25]. According to regulatory requirements, edible fats should not exceed the value of 4 mg KOH/g.

An official enzyme preparation LIPAZINE® obtained in the V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems may be used as preparation with lipase activity. It is a polypeptide fraction isolated from pork pancreas by fractionation in the presence of ammonium sulfate followed by dialysis and freeze-drying. It has a lipolytic activity of more than 4000 U/mg (1 unit of activity corresponds to the amount of enzyme releasing 1 μmol of fatty acids from 40 % emulsion of olive oil stabilized in the presence of 0.5 % polyvinyl alcohol at 37 °C in Tris buffer with pH of 9.0) [26,27,28].

For analytical purposes, it is possible to use pancreatic lipase from Serva (Germany) with a molecular weight of 50 kDa, specific activity of 13 U/mg (here 1 unit of activity corresponds to the amount of enzyme releasing 1 μmol of oleic acid per minute from a 50 % olive oil emulsion stabilized in the presence of 8 mg/ml sodium taurocholate at 37 °C in Tris/NaCl buffer at pH 9.2), and an aqueous (2:3) suspension of pork pancreas preserved in the presence of 2.5 % ethanol. Instead of native pancreas suspension, it is also possible to use PANCREATIN® with a proteolytic activity of 300 U/g, which is a purified and dried pork pancreas [29,30,31].

Figure 1 shows the dependence of acid value change on the time of exposure to pancreatin and other enzymes. The nature of the dependence confirms the presence of lipo-

lytic activity compared to the beef fat used. Pancreatin is known to have a poly-enzymatic action, and the pancreas itself cleavages virtually all biopolymer structures, including proteins, carbohydrates and lipids [30].

It is interesting that, as follows from the enzymatic degradation of animal fat given in Figure 1, *in vitro* process under the conditions described terminates within 3 to 6 hours, which roughly corresponds to the digestive process duration in mammals *in vivo*.

Optimum conditions for the biochemical transformation of lipids *in vitro* in the presence of enzymes may be considered as follows: 10–50 % water/oil emulsion of any natural fat or oil in aqueous or aqueous-salt medium, concentration of impurity salts up to 0.1 M, pH 8.0 to 8.5, temperature 50–60 °C, enzyme: substrate ratio depending on the specific lipase activity of the enzyme preparation used is 1:5 to 1:10 [30,32]. Under these conditions, it is possible to achieve high values of lipid transformation.

Biochemical lipid transformation by enzymes is a multi-stage process and proceeds according to the mechanism of a reversible biochemical reaction. First, one fatty acid is removed from triglyceride to form diglyceride followed by another fatty acid removal to form monoglyceride. Finally, the last fatty acid residue is removed to give pure glycerol and free fatty acids. All reactions at all stages are reversible, i.e. the release of fatty acid residue may be accompanied by the addition of another fatty acid. In practice, due to such a complex mechanism, the degree of transformation usually does not exceed 50 %. In this case, to solve the problem of yield increasing, it is necessary to use special methods of chemical balance shifting according to the Le Chatelier principle, for example, by removing the products from the reaction medium.

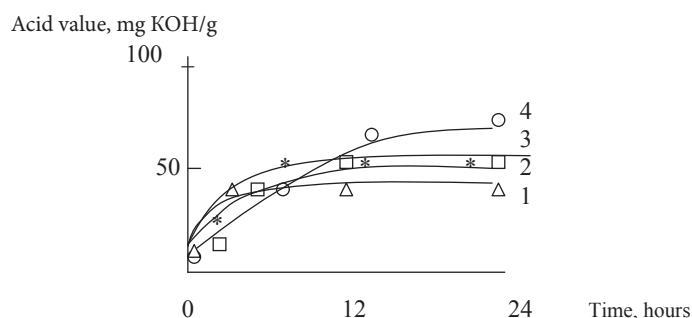


Figure 1. Dependence of the acid value change in enzymatic hydrolysis of 10 % beef fat emulsion on the treatment time at 50 °C, pH 8.0 and enzyme: substrate ratio of 1:8 in the presence of: 1 — lipazine, 2 — Serva lipase, 3 — pancreatin, 4 — pancreas suspension

It is reasonable to use a reversible reaction for the modification of natural fats with a non-optimal fatty acid composition.

Thus, to obtain special functional lipid products, it is reasonable to perform a joint enzymatic treatment of a mixture containing expensive animal fats, e.g. beef fat, with cheap vegetable oils, e.g. sunflower oil, which may lead to obtaining a lipid product with more favorable fatty acid composition [24,33].

Composition evaluation of the fatty acid fraction released from beef fat as a result of lipase treatment shows that saturated fatty acids, in particular about 40 % of palmitic and stearic acids, are predominantly released into the solution. The change in unsaturated fatty acid content under the effect of enzymes was less significant, in particular only 15 % of the oleic acid contained was released.

Thus, the use of animal lipases may be quite promising for modifying the fatty acid composition of low-grade fats with subsequent correction to optimal content, e.g. by transesterification [21,25].

The hydrolytic degradation of natural lipids in food circulation is the most important way of realizing the general significance and role of fats and oils as energy accumulators in the cells of living organisms. It is possible to directly use the chemical structure of lipids to obtain important technical products, i.e. liquid motor fuel from renewable raw materials such as all natural lipids.

From the literature it is known that the natural lipids contained in agricultural raw materials may be completely transformed into free fatty acids in the presence of acid-base catalysts. Free fatty acids are then converted into methyl esters for subsequent combustion in technical devices. This process, as well as enzymatic treatment, proceeds with insufficient yield due to the multistage nature and the inhibitory effect of water and biopolymers contained in raw materials [34,35].

A large amount of waste of animal origin at meat processing plants allows to consider animal fat waste as a promising raw material for obtaining high-energy products that can be used both as additives to mineral fuels and separately as an effective fuel, e.g. in small power plants and mini boiler houses [36].

Researchers concluded that vegetable oils, as well as waste of animal fat processing, are promising materials to use as alternative fuels for diesel engines. The use of raw vegetable oil may lead to technical problems associated with engine operation. Increased viscosity and low volatility of vegetable oils lead to large deposits, coking in the injector and sticking of the piston ring. These undesirable effects can be reduced or eliminated by esterification of fats and oils to form monoalkyl esters, a mixture of which is called biodiesel fuel [37,38,39,40].

Biotransformation of lipid raw material provides a viscosity of fuel close to the viscosity of conventional diesel fuel. Biodiesel attracts increased attention as an alternative, non-toxic, biodegradable and renewable product. Its properties have some differences depending on the type of raw material and alcohol used, however, it can always be used as a direct substitute for diesel fuel from petroleum products [41].

Despite its attractive properties, biodiesel from edible vegetable oils and animal fats cannot compete with diesel fuel from oil in terms of its economic indicators. However, today there is a large quantity of low-value oils and animal fats, e.g. wastes from restaurants, catering and food indus-

try enterprises that can be transformed to biodiesel. The main problem with the processing of such oils and fats is that they contain many free fatty acids that cannot simply be transformed into biodiesel using the traditional alkaline catalyst based on KOH [36].

In the meat industry, the process of animal fat neutralizing is performed to lower the acid value. It is carried out by adding a solution of caustic or calcined soda to form soap, which causes significant losses of raw materials [5]. Treatment with sulfuric acid makes it possible to eliminate these losses and obtain monoalkyl esters due to the transformation of free fatty acids. As processed raw materials, it is possible to use technical tallow (TT) containing 5, 20 and 40 % free fatty acids (FFA) and about 0.2 % water. For esterification, it is possible to use methyl alcohol (99.9 %) or absolute ethyl alcohol (99.5 %) in the presence of concentrated sulfuric acid. Fatty acid composition for samples of three types of lipid raw materials with different content of FFA is presented in Table 3.

Table 3. The main fatty acid composition of lipid raw materials with high content of free fatty acids

Fatty acid	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	Total saturated fatty acids, %
TT with 5 % FFA	1.7	17.3	1.9	15.6	42.5	9.2	0.4	34.6
TT with 20 % FFA	2.4	23.2	3.8	13.0	44.3	7.0	0.7	38.6
TT with 40 % FFA	1.7	22.8	3.1	12.5	42.4	12.1	0.8	37.0

Studies show [38,39] that the optimal FFA content limit in raw materials should be not more than 1 mg KOH/g (0.5 % free fatty acids), because at higher contents, FFA actively interact with alkaline catalyst causing losses due to the parallel formation of soap by the reaction: $\text{FFA} + \text{KOH} = \text{potassium salt of fatty acids (soap)} + \text{water}$. It should be noted that when using fat material of animal origin, the capacity to form emulsions is higher in comparison with raw materials of vegetable origin. An increase in alkaline catalyst concentration for neutralizing FFA causes the formation of very stable emulsion.

Acid catalysts are too slow and provide too low transformation to be used to transform animal and vegetable triglycerides to biodiesel, because this process requires a large (up to 20:1) excess of alcohol and a long reaction time (up to 5–10 h) (Figure 2).

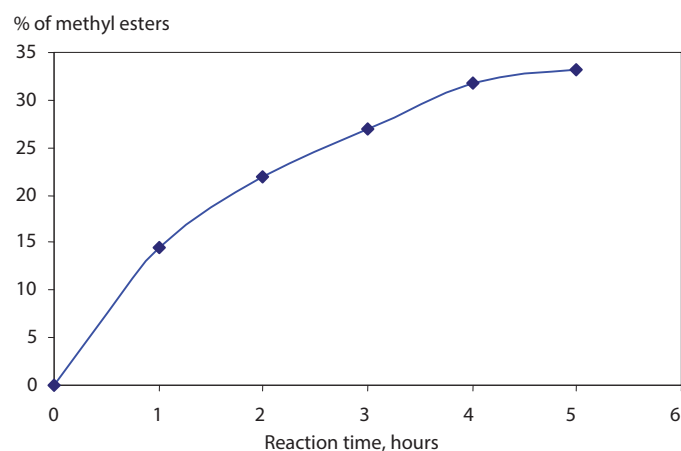


Figure 2. Processing of animal fat with 20 % FFA in the presence of methyl alcohol with molar ratio of 20:1 and 5 % concentrated sulfuric acid at 65 °C

However, acid catalysts are sufficiently effective to convert free fatty acids to esters, and as a result, their use is technically feasible.

Sulfuric acid treatment allows to reduce acid value of fat mixture to a level significantly lower than 2 mg KOH/g, which in future may increase the effectiveness of alkaline catalyst. This is due to the reaction development of free fatty acid esterification: $\text{FFA} + \text{methanol} = \text{methyl esters of fatty acids (biodiesel)} + \text{water}$, which is fairly effective in the presence of 5–10 % sulfuric acid.

The molar ratio of monohydric aliphatic alcohol to fatty raw material is one of the most important factors affecting the reaction rate. Using a lower molar ratio of alcohol to fat, less than 6:1, does not allow to lower the acid values to the required values. For a higher conversion rate of FFA to esters, it is possible to increase the molar ratio of alcohol from 10:1 to 30:1 depending on the type of alcohol, but this method is not cost-efficient. The optimum molar ratio is 9:1.

The effect of the catalyst amount on the acid value during 90 minutes of the experiment is shown in Table 4, for

Table 4. The effect of the catalyst amount and reaction time on the decrease in the acid value using methanol (methanol: fat ratio 9:1)

Reaction time, min	5 % FFA, mg KOH/g			20 % FFA, mg KOH/g			40 % FFA, mg KOH/g	
	0 % H_2SO_4	5 % H_2SO_4	15 % H_2SO_4	0 % H_2SO_4	5 % H_2SO_4	15 % H_2SO_4	5 % H_2SO_4	15 % H_2SO_4
0	11.30	11.30	11.30	41.28	41.28	41.28	91.20	91.20
1	9.04	3.54	3.42	39.05	15.93	15.85	28.33	21.76
15	6.88	0.93	0.68	38.00	11.40	5.76	25.00	18.06
30	4.97	—	—	36.20	8.30	3.53	20.43	15.63
45	3.02	—	—	34.07	3.98	1.50	19.22	11.12
60	1.50	—	—	33.15	1.77	0.70	18.30	7.15
75	0.83	—	—	32.35	1.24	—	17.09	3.76
90	—	—	—	30.87	0.56	—	15.68	1.02

Table 5. The effect of the catalyst amount and reaction time on the decrease in the acid value using ethanol (ethanol: fat ratio 9:1)

Reaction time, min	5 % FFA		20 % FFA		40 % FFA	
	5 % H ₂ SO ₄	15 % H ₂ SO ₄	5 % H ₂ SO ₄	15 % H ₂ SO ₄	5 % H ₂ SO ₄	15 % H ₂ SO ₄
0	11.30	11.30	41.28	41.28	91.20	91.20
1	3.29	3.04	8.64	8.03	12.35	10.22
15	0.74	0.51	7.01	5.02	11.85	8.45
30	—	—	5.62	2.94	10.00	6.57
45	—	—	4.23	0.72	9.04	5.05
60	—	—	3.06	—	8.12	4.43
75	—	—	1.00	—	7.40	2.34
90	—	—	—	—	7.09	0.62

molar ratio of methanol to raw material of 9:1. It is seen, that with zero amount of catalyst, the acid value achieved optimal results at the end of the experiment only when processing fat with 5 % FFA. However, in the presence of the catalyst, a rapid decrease in the acid value occurs, which was observed immediately after the addition of methanol and sulfuric acid solution to raw material with high FFA content. The acid value for raw materials with 20 % FFA may be reduced from 41 to 0.56 mg KOH/g for 90 minutes with 5 % of acid catalyst and to 0.7 mg KOH/g for 60 minutes with 15 % of acid catalyst. For raw materials with 40 % FFA, the acid value may be reduced from 90 to 15 mg KOH/g for 90 minutes with 5 % of acid catalyst. When 15 % H₂SO₄ is used, the acid value can quickly reach the target value of 1.0 mg KOH/g.

The type of alcohol used affects the results of esterification of fatty acids, since the replacement of toxic methanol by a relatively safe ethanol is highly desirable for practical use (Table 5). A faster decrease in the acid value with ethanol may be due to a higher reaction temperature and a higher solubility of ethanol in fats and esters. The final acid values for ethanol reaction with TT containing 40 % FFA are usually lower than for methanol.

For the full transformation of FFA derived from animal lipids, a multistage process is necessary. At the end of each stage lasting for 0.5 hours, the reaction mixture must be left to settle for 0.5 to 2 hours and the fraction of alcohol with water is to be removed. The process requires three to four repetitions. For raw materials with 5 % FFA, a single-stage process lasting 15 minutes with 5 % acid catalyst is sufficient. For raw materials with 20 % FFA, the most optimal is two-stage esterification for 30 minutes with 15 % acid catalyst or three-stage esterification for 30 minutes with 5 % acid catalyst. For raw materials with 40 % FFA, the most optimal option is a three-stage esterification for 30 minutes with 15 % acid catalyst decreasing FFA to the desired level for further processing [42].

After the acid value for TT with a high content of free fatty acids decreases to less than 2 mg KOH/g during the multistage treatment, it is possible to continue the process in the presence of 1 % alkali using methanol or ethanol with molar ratio of 6:1 at a temperature close to alcohol boiling

point at atmospheric pressure. The yield of the process is shown in Table 6.

Table 6. The yield of monoalkyl esters derived from raw materials with a high content of free fatty acids

Raw material	Yield %
<i>Ethanol</i>	
5 % FFA	93
15 % FFA	77
40 % FFA	60
<i>Methanol</i>	
5 % FFA	95
15 % FFA	80
40 % FFA	65

The use of various alcohols in combination with wastes of lipid raw materials of various origins makes it possible to transform this type of renewable raw material into technical products. The origin of raw materials does not affect the mechanism of biochemical transformation, since varying the conditions of the process allows to obtain acceptable results. Alkyl esters may be converted to mixtures of fatty acids isolated both from vegetable and animal/fish sources. The optimal conditions for three- to four-stage transformation are: temperature 65 to 75 °C, sulfuric acid concentration 1 to 5 % of raw material weight, alcohol to raw material ratio 5:1 to 20:1, the duration of a stage 0.5 to 2 hours. The specified parameters allow to receive biofuel from natural lipids with high enough yield.

Conclusions

Thus, a brief discussion of the chemical and biochemical transformation of natural lipids shows that it is possible to perform these processes either with simulation of the natural conditions of living systems in vivo by performing enzymatic in vitro processing or with advanced lipid transformation according to the laws of classical organic chemistry.

The transition to a highly effective and environmentally friendly agro- and aquaculture, the development and implementation of systems for the rational use of chemical and biological protection tools for agricultural plants and animals, the storage and effective processing of agricultur-

al products, the creation of safe and quality food products, including functional ones, are nowadays among the high priority aspects determined in the Strategy of the Russian Federation's scientific and technological development. Therefore, a review of the conditions for the process of natural lipid biochemical transformation in the presence of enzymes shows that there is the possibility of controlled transesterification of fats, which in practice allows to per-

form biocorrection of the lipid chemical composition in order to obtain products with a fully balanced fatty acid composition, which is not characteristic of the most fats and oils. Such products may be used as functional, therapeutic and protective ones.

Advanced processing of fats and oils by complete degradation allows to receive technical products with the possibility of their use in fuel systems.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Нечаев, А.П., Траубенберг, С.Е., Кочеткова, А.А., Колпакова, В.В., Витол, И.С., Кобелева, И.С. (2015). Пищевая химия. СПб, Гиорд. — 642 с. ISBN978-5-98879-196-6.
2. Энциклопедический словарь. Мясная промышленность. (2015). Под ред. А.Б. Лисицына. М, ВНИИМП. — 246 с. ISBN978-5-901768-26-6.
3. Иванкин, А.Н., Неклюдов, А.Д., Вострикова, Н.Л. (2011). Биологически активные соединения природного происхождения. Saarbrücken, Lambert Academic Publishing. — 488 с. ISBN: 9783844356878.
4. Никитина, М.А., Захаров, А.Н., Насонова, В.В., Лисицын, А.Б. (2017). Моделирование как метод научного познания сложных мясных систем. *Теория и практика переработки мяса*, 2(3), 66–78.
5. Лисицын, А.Б., Иванкин, А.Н., Неклюдов, А.Д. (2002). Методы практической биотехнологии. М, ВНИИМП. — 402 с.
6. Лисицын, А.Б., Никитина, М.А., Захаров, А.Н., Сусь, Е.Б., Насонова, В.В. (2016). Моделирование качества мясной продукции. *Пищевая промышленность*, 10, 50–54.
7. Lisitsyn, A.B., Kriger, O.V., Mitrokhin, P.V. (2016). Study of chemistry and hydrolysates drying parameters of feather-downy raw material. *Foods and Raw Materials*, 4(1), 44–50.
8. Вострикова, Н.Л., Куликовский, А.В., Иванкин, А.Н., Беляков, В.А., Тарасов, С.М. (2018). Обзор биохимических особенностей получения пищи на основе современных пищевых систем. *Все о мясе*, 1, 10–15.
9. Неклюдов, А.Д., Иванкин, А.Н. (2007). Коллаген: получение, свойства и применение. М, ГОУ ВПО МГУЛ. — 336 с. ISBN5-8135-0376
10. Иванкин, А.Н. (2007). Жиры в составе современных мясных продуктов. *Мясная индустрия*, 6, 8–13.
11. Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Berdutina, A.V. (2000). Properties and uses of protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 452–459.
12. Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 24–112.
13. О'Брайен, Р. (2007). Жиры и масла. Производство, состав и свойства, применение. СПб, Профессия. — 752 с.
14. Иванкин, А.Н., Олиференко, Г.А., Куликовский, А.В., Чернуха, И.М., Семенова, А.А., Спиридонов, К.И., Насонова, В.В. (2016). Определение ненасыщенных жирных кислот с мигрирующей двойной связью в сложных биологических матрицах методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным и масс-спектрометрическим детектированием. *Журнал аналитической химии*, 71(11), 1188–1195.
15. Ivankin, A.N., Kulikovskii, A.V., Vostrikova, N.L., Chernuha, I.M. (2014). Cis- and trans- conformational changes of bacterial fatty acids in comparison with analogs of animal and vegetable origin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50(6), 668–674.
16. Патент 2385900. Способ получения жидкого биотоплива/ Бабурина М.И., Горохов Д.Г., Иванкин А.Н. (2010). Опубл. 2010. Бюл. № 10.
17. Бабурина, М.И., Горохов, Д.Г., Иванкин, А.Н. (2010). Производство биодизельного топлива из жирослама и отработанных фритюрных жиров. *Мясная индустрия*, 3, 64–65.
18. German, A.B., Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Berdutina, A.V. (2002). Kinetics of hydrolysis of animal fat by pancreatic lipase. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6), 517–520.
19. Иванкин, А.Н., Неклюдов, А.Д. (2002). Экологические основы биотехнологических процессов. М, МГУЛ. — 404 с.
20. Иванкин, А.Н., Горбунова, Н.А. (2009). Биоактивные нанокомпоненты в мясных продуктах. *Мясные технологии*, 11, 36–39.
21. Ivankin, A.N., Vostrikova, N.L. (2012). Biochemical transformations of lipide and carbohydrate-protein nano complex in liquid foodstuff. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2 (3), 27–32.
22. Устинова, А.В., Тимошенко, Н.В. (1997). Мясные продукты для детского питания. М, ВНИИМП. — 251 с.
23. Neklyudov A.D., Ivankin A.N. (2002). Biochemical processing of fats and oils as well as lipid products with improved biological and physicochemical properties: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(5), 399–409.
24. Неклюдов, А.Д., Иванкин, А.Н., Бердудина, А.В. (2003). Основы биохимической переработки животного и комбинированного сырья. — М, ВНИИМП. — 116 с.
25. AL-Jawadi, A., Moussa, H., Ramalingam, L., Dharamawardhane, S., Gollahon, L., Gunaratne, P., Layeequr Rahman, R., Moustaid-Moussa, N. (2018). Protective properties of n-3 fatty acids and implications in obesity-associated breast cancer. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 53, 1–8.
26. Ravindran, V., Tanchaenrat, P., Zaefarian, F., Ravindran, G. (2016). Fats in poultry nutrition: Digestive physiology and factors influencing their utilization. *Animal Feed Science and Technology*, 213, 1–21.
27. Иванкин, А.Н. Неклюдов, А.Д. Бердудина, А.В. Карпо, Б.С. Миталева, С.И. Евстафьева Е.А. (2000). Перспективы переработки пищевых жиров методом фракционирования. *Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова М, ВНИИМП*, 258–262.
28. Липазин. Временная фармакопейная статья. ВФС 42-2817-96.
29. Lisitsin, A.B., Ivankin, A.N., Chernuha, I.M., Yushina, Yu. K. (2010). Specifics of lipid composition of animal raw materials. *Proceedings of the 56th International Congress of Meat Science and Technology, Jeju, Korea*. D028
30. Иванкин, А.Н., Илюхина, Р.В. (2001). О биотехнологической переработке низкоценных животных жиров. *Мясная индустрия*, 5, 46–47.
31. Díaz, M.T., Álvarez, I., De la Fuente, J., Sañudo, C., Campo, M.M., Oliver, M.A., Font, F.M., Montossi, F., San Julián, R., Nute, G.R., Cañeque, V. (2005). Fatty acid composition of meat from typical lamb production systems of Spain, United Kingdom, Germany and Uruguay. *Meat Science*, 71(2), 256–263.
32. Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Baburina, M.I. (1998). Production and properties of pancreatin immobilized on carboxymethylcellulose. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 34(1), 57–61.
33. Любецкая, Т.Р., Бронникова, В.В., Прошина, О.П., Фадеев, Г.Н., Болдырев, В.С., Иванкин, А.Н. (2017). Цис-, транс-изомеризация бинарных смесей жиров растительного и животного происхождения. *Все о мясе*, 6, 52–55.
34. Chou, C.C., Tzeng, P.S., Wang, G.J., Su, Y.H., Chiang, C.J., Ku, Y.Y. (2014). Numerical study of a turbo-charged common-rail diesel engine fueled with various biodiesel blends. *Energy Procedia*. 61. 1146–1149.
35. Gonçalves, M., Rodrigues, R., Galhardo, T.S., Carvalho, W.A. (2016). Highly selective acetalization of glycerol with acetone to solketal over acidic carbon-based catalysts from biodiesel waste. *Fuel*, 181, 46–54.
36. Иванкин, А.Н., Болдырев, В.С., Жилин, Ю.Н., Олиференко, Г.А., Бабурина, М.И., Куликовский А.В. (2017). Макрокинетическая трансформация природных липидов для получения моторного топлива. *Вестник Московского государственного технического университета им. Н.Э. Баумана. Серия: Естественные науки*, 5(74), 95–108.
37. Иванкин, А.Н., Бабурина, М.И., Горбунова, Н.А., Неклюдов, А.Д. (2008). Экологическая система получения биотоплива из

липидсодержащих отходов сельскохозяйственного производства. *Экологические системы и приборы*, 6, 57–59.

38. Eguchi, S., Kagawa, S., Okamoto, S. (2015). Environmental and economic performance of a biodiesel plant using waste cooking oil. *Journal of Cleaner Production*, 101, 5369, 245–250.

39. Bozbas, K. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(2), 542–552.

40. Горохов, Д.Г., Бабурина, М.И., Иванкин, А.Н., Прошина, О.П. (2010). Жидкое биотопливо из растительного и животного

сырья. Технические и экономические аспекты. *Вестник московского государственного университета леса — Лесной вестник*, 4, 74–78.

41. Лисицын, А.Б., Липатов, Н.Н., Кудряшов, Л.С., Алексахина, В.А., Чернуха, И.М. (2004). Теория и практика переработки мяса. М, ВНИИМП, 2004. — 378 с. ISBN: 5-901768-14-0

42. Горохов, Д.Г., Бабурина, М.И., Иванкин, А.Н. (2008). Биодизельное топливо из животных жиров. *Мясная индустрия*, 11, 60–63.

REFERENCES

- Nechaev, A.P., Traubenberg, S.E., Kochetkova, A.A., Kolpakova, V.V., Vitol, I.S., Kobeleva, I.S.. (2015). Food Chemistry. St. Petersburg: Giorde. — 642 p. ISBN97-5-98879-196-6. (In Russian)
- Collegiate Dictionary. Meat industry. (2015) Ed. A.B. Lisitsyn. M: VNIIMP. — 246 c. ISBN978-5-901768-26-6. (In Russian)
- Ivankin, A.N., Neklyudov, A.D., Vostrikova, N.L. (2011). Biologically active compounds of natural origin. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing.—488 p. ISBN: 9783844356878. (In Russian)
- Nikitina, M.A., Zakharov, A.N., Nasonova, V.V., Lisitsyn, A.B. (2017). Modeling as a method of scientific knowledge of complex meat systems. *Theory and practice of meat processing*, 2(3), 66–78. (In Russian)
- Lisitsyn, A.B., Ivankin, A.N., Neklyudov, A.D. (2002). Methods of practical biotechnology. M: VNIIMP.—402 p. (In Russian)
- Lisitsyn, A.B., Nikitina, M.A., Zakharov, A.N., Sus', E.B., Nasonova, V.V. (2016). Modeling of Meat Products the Quality. *Food industry*, 10, 50–54. (In Russian)
- Lisitsyn, A.B., Kriger, O.V., Mitrokhin, P.V. (2016). Study of chemistry and hydrolysates drying parameters of feather-downy raw material. *Foods and Raw Materials*, 4(1), 44–50.
- Vostrikova, N.L., Kulikovskiy, A.V., Ivankin, A.N., Belyakov, V.A., Tarasov, S.M. (2018). Review of biochemical features of food production based on modern food systems. *Vsyo o myase*, 1, 10–15. (In Russian)
- Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N. (2007). Collagen: production, properties and application. M: MGUL.—336 p. ISBN5-8135-0376 (In Russian)
- Ivankin, A.N. (2007). Fats in the composition of modern meat products. *Meat industry*, 6, 8–13. (In Russian)
- Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Berdutina, A.V. (2000). Properties and uses of protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 452–459.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 24–112.
- O'Brien, R. (2007). Fats and oils. Production, composition and properties, application. St. Petersburg: Profession. — 752 p. (in Russian)
- Ivankin, A.N., Oliferenko, G.L., Kulikovskii, A.V., Chernuha, I.M., Semenova, A.A., Spiridonov, K.I., Nasonova, V.V. (2016). Determination of unsaturated fatty acids with a migrating double bond in a complex of matrices by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(11), 1131–1137.
- Ivankin, A.N., Kulikovskii, A.V., Vostrikova, N.L., Chernuha, I.M. (2014). Cis- and trans-conformational changes of bacterial fatty acids in comparison with analogs of animal and vegetable origin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50(6), 668–674.
- Baburina M.I., Gorokhov D.G., Ivankin A.N. Method for obtaining liquid biofuel. Patent RF, no. 2385900? 2010. (In Russian)
- Baburina, M.I., Gorokhov, D.G., Ivankin, A.N. (2010). Production of biodiesel from grease and waste fats. *Meat industry*. 3, 64–65. (In Russian)
- German, A.B., Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Berdutina, A.V. (2002). Kinetics of hydrolysis of animal fat by pancreatic lipase. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6), 517–520.
- Ivankin, A.N., Neklyudov, A.D. (2002). Ecological bases of biotechnological processes. M: MGUL.—404 p. (In Russian)
- Ivankin, A.N., Gorbunova, N.A. (2009). Bioactive nanocomponents in meat products. *Meat technologies*, 11, 36–39. (In Russian)
- Ivankin, A.N., Vostrikova, N.L. (2012). Biochemical transformations of lipide and carbohydrate-protein nano complex in liquid foodstuff. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2(3), 27–32.
- Ustinova, A.V., Timoshenko, N.V. (1997). Meat products for baby nutrition. Moscow: VNIIMP.—251 p. (In Russian)
- Neklyudov A.D., Ivankin A.N. (2002). Biochemical processing of fats and oils as well as lipid products with improved biological and physicochemical properties: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(5), 399–409.
- Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Berdutina, A.V. (2003). Basics of biochemical processing of animal and combined raw materials. M: VNIIMP.—116 p. (In Russian)
- AL-Jawadi, A., Moussa, H., Ramalingam, L., Dharamawardhane, S., Gollahon, L., Gunaratne, P., Layeequr Rahman, R., Moustaid-Moussa, N. (2018). Protective properties of n-3 fatty acids and implications in obesity-associated breast cancer. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 53, 1–8.
- Ravindran, V., Tanchaoenrat, P., Zaefarian, F., Ravindran, G. (2016). Fats in poultry nutrition: Digestive physiology and factors influencing their utilization. *Animal Feed Science and Technology*, 213, 1–21.
- Ivankin A.N. Neklyudov A.D., Berdutin A.V., Karpo B.S., Mitalieva S.I., Evstafieva E.A. (2000). Perspectives of processing of food fats by the method of fractionation. *International scientific and practical conference dedicated to the memory of Vasily Matveyevich Gorbato. M: VNIIMP*, 258–262. (In Russian)
- Lipazine. Pharmacopeial article. No. 42–2817–96. (In Russian)
- Lisitsyn, A.B., Ivankin, A.N., Chernuha, I.M., Yushina, Yu. K. (2010). Specifics of lipid composition of animal raw materials. *Proceedings of the 56th International Congress of Meat Science and Technology, Jeju, Korea*, D028.
- Ivankin, A.N., Ilyukhina, R.V. (2001). About biotechnological processing of low-value animal fats. *Meat industry*, 5, 46–47. (In Russian)
- Díaz, MT, Álvarez, I., De la Fuente, J., Sañudo, C., Campo, MM, Oliver, MA, Font, FM, Montossi, F., San Julián, R., Nute, GR, Cañeque, V. (2005). Fatty acid composition of meat from typical lamb production systems of Spain, United Kingdom, Germany and Uruguay. *Meat Science*, 71(2). 256–263.
- Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Baburina, M.I. (1998). Production and properties of pancreatin immobilized on carboxymethylcellulose. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 34 (1), 57–60.
- Lyubetskaya, T.R., Bronnikova, V.V., Proshina, O.P., Fadeev, G.N., Boldyrev, V.S., Ivankin, A.N. (2017). Cis-, trans-isomerization of binary mixtures of fats of vegetable and animal origin. *Vsyo o myase*, 6, 52–55. (In Russian)
- Chou, C.C., Tzeng, P.S., Wang, G.J., Su, Y.H., Chiang, C.J., Ku, Y.Y. (2014). Numerical study of a turbo-charged common-rail diesel engine fueled with various bio-diesel blends. *Energy Procedia*, 61, 1146–1149.
- Gonçalves, M., Rodrigues, R., Galhardo, T.S., Carvalho, W.A. (2016). Highly selective acetalization of glycerol with acetone to solketal over acidic carbon-based catalysts from biodiesel waste. *Fuel*, 181, 46–54.
- Ivankin, A.N., Boldyrev, V.S., Zhilin, Yu.N., Oliferenko, G.L., Baburina, M.I., Kulikovskii A.V. (2017). Macrokinetic transformation of natural lipids for motor fuels production *Herald of the Bauman Moscow State Technical University. Series Natural Sciences*, 5, 95–105. (In Russian)
- Ivankin, A.N., Baburina, M.I., Gorbunova, N.A., Neklyudov, A.D. (2008). The ecological system of production of a biofuel from oil containing waste of agriculture *Ecological systems and devices*, 6, 57–59. (In Russian)
- Eguchi, S., Kagawa, S., Okamoto, S. (2015). Environmental and economic performance of a biodiesel plant using waste cooking oil. *Journal of Cleaner Production*, 101, 5369, 245–250.
- Bozbas, K. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(2), 542–552.
- Gorokhov, D.G., Baburina, M.I., Ivankin, A.N., Proshina, O.P. (2010). Liquid biofuel from vegetable and animal raw materials. Technical and economic aspects. *Forestry Bulletin*, 4, 74–78.

41. Lisitsyn, A.B., Lipatov, N.N., Kudryashov, L.S., Aleksakhina, V.A., Chernukha, I.M. (2004). Theory and practice of meat processing. M: VNIIMP.—378 p. ISBN: 5-901768-14-0 (In Russian)

42. Gorohov, D.G., Baburina, M.I., Ivankin, A.N. (2008). Biodiesel fuel from animal fats. *Meat industry*, 11, 60–64. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Бабурина Марина Ивановна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-98-91
E-mail: m.baburina@fncps.ru

Вострикова Наталия Леонидовна — кандидат технических наук, заведующий лабораторией «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-79-81
E-mail: n.vostrikova@fncps.ru

Иванкин Андрей Николаевич — доктор химических наук, профессор, академик МАН ВШ, заведующий кафедрой химии, Московский государственный технический университет (национальный исследовательский университет) им. Н.Э. Баумана
141005, г. Мытищи, 1-я Институтская, 1
Тел.: +7-498-687-36-00
e-mail: aivankin@inbox.ru
*автор для переписки

Зенкин Александр Николаевич — магистр, Московский государственный технический университет (национальный исследовательский университет) им. Н.Э. Баумана
105005, Москва, ул. 2-я Бауманская, д. 5
Тел.: +7-495-676-98-91
e-mail: zensanches@mail.ru

Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.
Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 17.07.2018

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Marina I. Baburina — candidate of biological sciences, leading research scientist, V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-98-91
E-mail: m.baburina@fncps.ru

Natal'ya L. Vostrikova — candidate of technical sciences, head of laboratory Scientific and methodical work, biological and analytical research, V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-79-81
E-mail: n.vostrikova@fncps.ru

Andrew N. Ivankin — doctor of chemical sciences, professor, academician of the International Higher Education Academy of Sciences, Head of the Department of Chemistry, Bauman Moscow State Technical University
141005, Mitishi, 1-st Institutskaia str., 1
Tel.: +7-498-687-36-00
e-mail: aivankin@inbox.ru
*corresponding author

Aleksandr N. Zenkin — magistr, Bauman Moscow State Technical University
105005, Moscow, Russia, 2 st. Baumanskaya str., 5,
Tel.: +7-495-676-98-91
e-mail: zensanches@mail.ru

Contribution

All authors bear responsibility for the work and presented data.
All authors made an equal contribution to the work.
The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 12.07.2018

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДОЛОГИИ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ

Лукинова Е.А., Котенкова Е.А.,* Полищук Е.К.

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

Ключевые слова: антимикробные вещества, грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии, проточная цитометрия

Аннотация

В данной статье освещена проблема применения химических консервантов в пищевой промышленности, рассмотрены перспективы использования веществ природного происхождения с антимикробной направленностью действия для пролонгирования сроков хранения и улучшения качества пищевой продукции. Предложены способы выделения антимикробных веществ из эпителиальных и слизистых тканей животного происхождения с учетом минимизации потерь их биологической активности в соответствии со строением белково-пептидных молекул. На основании результатов определения антимикробной активности по отношению к *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* с использованием метода проточной цитометрии с красителями Eva Green и PI определено наиболее перспективное сырье и целесообразность применения слабокислотной экстракции с последующим трипсинолизом для высвобождения антимикробных веществ из препробелковых молекул и ультрафильтрации для очистки от высокомолекулярных соединений.

Original scientific paper

INFLUENCE OF APPROACHES TO ISOLATION OF ANIMAL BIOACTIVE SUBSTANCES ON ANTIMICROBIAL ACTION

Ekaterina A. Lukinova, Elena A. Kotenkova,* Ekaterina K. Polischuk

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

Key words: antimicrobial substances, gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, flow cytometry

Abstract

This article highlights the problem of the use of chemical preservatives in the food industry. The prospects of implementation natural substances with an antimicrobial effect for prolonging shelf life and improving the quality of food products are also discussed. Methods for isolating of antimicrobial substances from epithelial and mucous tissues of animal origin are proposed, taking into account the minimization of losses of their biological activity in accordance with the structure of protein-peptide molecules. Based on the results of the determination of antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using flow cytometry, stains Eva Green and PI, the most promising raw materials were determined and the feasibility of using weakly acid extraction followed by trypsinolysis for releasing antimicrobial substances from preprotein molecules and ultrafiltration for purification from high-molecular compounds were investigated.

Введение

С давних пор люди использовали абсолютно разные способы продления срока годности пищевых продуктов: копчение, вяление, соленье, добавление специй, использование сахара, квашение и т.д. На современном этапе развития пищевой промышленности классифицируют физические, химические и биологические методы консервации продуктов питания [1,2]. В настоящее время применяют различные консерванты и антиоксиданты химического синтеза (например, Е-200-Е-399). Добавки используются во всех областях пищевой промышленности, но большинство из них запрещены во многих странах мира, в том числе

и в Российской Федерации, из-за их небезопасности для здоровья человека и побочных эффектов при постоянном употреблении в пищу, ввиду чего особо остро стоит проблема поиска альтернативных природных веществ, продлевающих сроки годности продуктов.

В последнее время увеличивается спрос потребителей на продукты здорового питания, которые в том числе не содержат синтетические пищевые добавки [2]. В настоящее время уже используются такие коммерческие природные консерванты как низин «Nisaplin» (Великобритания), лизоцим «Clerizym Granulate» (Италия), натамицин «Natamycin» (Франция), а также

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Лукинова Е.А., Котенкова Е.А., Полищук Е.К. Изучение антимикробных свойств биологически активных веществ животного происхождения в зависимости от методологии их выделения. Теория и практика переработки мяса. 2018;3(3): 27-35. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-27-35

FOR CITATION: Lukinova E.A., Kotenkova E.A., Polischuk E.K. Influence of approaches to isolation of animal bioactive substances on antimicrobial action. Theory and practice of meat processing. 2018;3(3): 27-35. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-27-35

различные специи, либо выделенные из них антиоксиданты [3].

Достаточно перспективными в этой связи являются антимикробные вещества с выраженным антибактериальным действием. Многочисленные исследования способствовали созданию базы данных The Antimicrobial Peptide Database [4] содержащей систематизированную информацию о 2818 антимикробных пептидах из царств бактерий, грибов, простейших, архей, растений и животных

Наиболее интенсивное исследование АМП наблюдалось в течение последних десяти лет. Одними из первых открытых антимикробных пептидов были α -дефензины и кателицидины [5], с тех пор этот список существенно пополнился и включает в себя магейнины [6], гистатины [7], азуроцирины [8], сфенисцины [9], плероцидины [10], дермасептины [11], цекропины [12], мелиттин [13], а также многие другие.

В России основоположниками изучения антимикробных пептидов были такие ученые как Кокряков В.Н. (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург), Шамова О.В. (Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова, Санкт-Петербург) и Овчинникова Т.В. (Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва) [14,15,16,17].

Известно, что животные ткани содержат огромное количество биоактивных соединений, обладающих различными фармакологическими свойствами [18]. Большинство изученных АМП млекопитающих были выделены из нейтрофильных гранулоцитов, однако они также были обнаружены в тонком кишечнике, языке, миелоидных и эпителиальных клетках, хоть и в меньшем количестве. Это позволяет рассматривать в качестве источника антимикробных веществ не только гранулярный аппарат, но и ткани слизистых оболочек млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных. Данные области, являясь пограничными зонами, постоянно контактирующими с широким спектром разнообразных биологических агентов, в том числе патогенными и условно-патогенными микроорганизмами и вирусами, агентами грибковой природы, потенциально могут содержать набор веществ антимикробной направленностью действия.

Особое внимание следует уделять именно выделению белково-пептидных компонентов ввиду их строения с обязательным учетом сохранения их биологической активности. Для достаточной степени измельчения пограничных зон, целесообразным считается применение технологии криоизмельчения в нескольких повторях. У большинства антимикробных веществ изоэлектрическая точка находится в щелочной среде, что обусловлено их строением, поэтому при их экстракции предпочтительно использование кислотных растворов. Кроме того, при высокой ионной силе они склонны к потере своей биологической

активности, именно поэтому использование солевых растворов нежелательно. Для удаления коллоидной взвеси, образующейся в ходе экстракции за счет присутствия в тканях большого количества соединительнотканых белков (коллаген и эластин), рациональным считается центрифугирование экстрактов [19,20,21]. По данным международной базы UniProt Protein Database, антимикробные пептиды содержатся в живом организме чаще всего в виде препробелка, то есть содержат в себе «проструктурную область», сигнальный пептид и сам зрелый пептид [3,4], поэтому целесообразно применять протеолитические ферменты (например, трипсин, пепсин, эластаза). Для разделения по молекулярным массам белково-пептидных веществ достаточно эффективно применяется ультрафильтрация [22]. Материал для изготовления УФ-фильтров, как правило, инертен к белковым веществам, не вызывает их адгезию и инактивацию, а сам метод быстрый и простой для воспроизведения.

Объекты и методы

Объектами исследования являлись пограничные зоны слизистых оболочек языка, гортани, подчелюстных слюнных желез, подчелюстных лимфатических узлов, носовой и ротовой полостей и прямой кишки говядины. Образцы отбирали на мясокомбинате ООО «КПРОС», Московская обл., Истринский р-н, д. Денежкино. Активность выделенных антимикробных пептидов рассматривали в полученных нативных экстрактах после нейтрализации, в экстрактах после ферментализации и ультрафильтрации с молекулярной массой меньше 50 кДа.

Образцы слизистых оболочек экстрагировали раствором 10 % уксусной кислоты при гидромодуле 1:5, скорости перемешивания 400 об/мин, в течение 5 часов при (4–5) °С на ЛДУ (Лаботекс, Россия). Затем экстракты центрифугировали (Sigma 3K30, Германия) при 15000 об/мин и 4,0 °С, в течение 5 мин, отбирали надосадочную жидкость. Супернатант нейтрализовали до pH=6 раствором гидроксида натрия с концентрацией 4 моль/л. Далее часть нейтрализованных экстрактов подвергали трипсинолизу (PanReac, активность 328 USP U/mg), часть — ультрафильтрации на центрифужных ультрафильтрах Амикон Ультра- (50КДа, Millipore). Схема выделения наглядно представлена на Рис. 1.

Для определения антимикробной активности нейтрализованных нативных образцов и образцов после обработки трипсином по отношению к *Listeria monocytogenes* с использованием Eva Green 50 мкл образца смешивали с 50 мкл культуры (106 кл/мл), инкубировали ночь в термостате при 37 °С. К 20 мкл смеси добавляли 5 мкл Eva Green, добавляли 365 мкл деионизированной воды и 10 мкл DMSO (чтобы убрать фоновую красную флуоресценцию), инкубировали в темноте 10–15 мин, измеряли живые и мер-

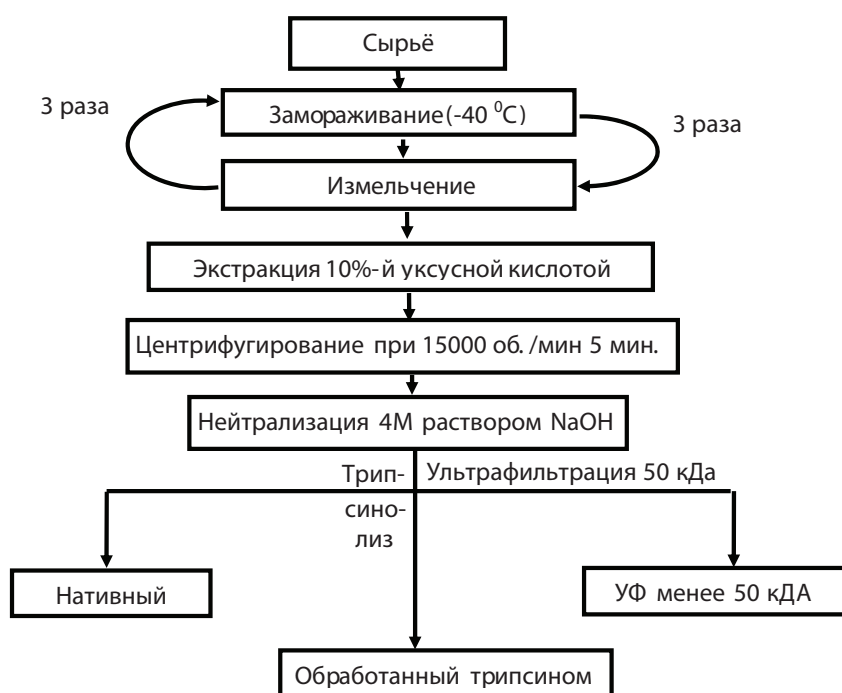


Рис. 1. Схема выделения антимикробных пептидов из животного сырья

твые клетки на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore).

Для определения антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* нейтрализованных нативных образцов и образцов после ультрафильтрации (Мм менее 50 кДа) с использованием Eva Green и PI 10 мкл образца смешивали с 90 мкл культуры (106 кл/мл), инкубировали ночь в термостате при 37 °С. К 20 мкл смеси добавляли 5 мкл Eva Green, добавляли 365 мкл деионизированной воды и 10 мкл DMSO (чтобы убрать фоновую красную флуоресценцию), инкубировали в темноте 10–15 мин, измеряли живые клетки на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore). К 20 мкл смеси добавляли 3 мкл PI, добавляли 377 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, инкубировали в темноте 10–15 мин, измеряли мертвые клетки на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore).

Результаты и обсуждение

Определение антимикробной активности по отношению к *Listeria monocytogenes* нативных образцов и обработанных трипсином методом проточной цитометрии с использованием красителя Eva Green представлено в Табл. 1.

Наибольшей активностью обладали образцы слизистых прямой кишки и ротовой полости, доля живых клеток снижалась до 2,7 %, обработка трипсином в отношении слизистых оболочек языка, подчелюстных слюнных желез и лимфатических узлов приводила к увеличению активности, в случае слизистых оболочек гортани, носовой полости и прямой кишки — не оказывала влияние на активность, а в отношении слизистой оболочки ротовой полости — напротив, снижала.

Таблица 1. Результаты определения антимикробной активности по отношению к *Listeria monocytogenes* нативных образцов и обработанных трипсином методом проточной цитометрии с использованием красителя Eva Green

Образец	% живых клеток	
	Нативные	Обработанные трипсином
Контроль (положительный)	92,3 %	
Контроль (отрицательный)	4,1 %	
Слизистая языка	81,9 %	36,2 %
Слизистая гортани	98,8 %	100,0 %
Подчелюстные слюнные железы	82,3 %	11,1 %
Подчелюстные лимфатические узлы	62,5 %	44,4 %
Слизистая носовой полости	100,0 %	100,0 %
Слизистая прямой кишки	20,8 %	96,4 %
Слизистая ротовой полости	2,7 %	6,0 %

Определение антимикробной активности по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* нативных образцов и образцов после УФ (Мм менее 50 кДа) методом проточной цитометрии с использованием красителя Eva Green и PI представлено в Табл. 2.

Наибольшей активностью обладали слизистые оболочки языка и носовой полости, доля выживших клеток снижалась до 22,0 %, увеличение количества клеток в некоторых случаях практически в 2 раза наблюдалось при добавлении к культуре экстрактов лимфатических узлов, слизистых оболочек ротовой полости и прямой кишки, однако в этих же образцах отмечалось наличие сохранившихся мертвых клеток (прокрашивались PI), величина которых достигала 51,6 % от всех клеток. Предположительно, это наблюдение связано с тем, что АМП «упакованы» в белковую молекулу, которая может использоваться микроорганизмами изначально

Таблица 2. Результаты определения антимикробной активности по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* нативных образцов и образцов после УФ (Мм менее 50 кДа) методом проточной цитометрии с использованием красителей Eva Green и PI

Образец	Нативные		после УФ (Мм менее 50 кДа)	
	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвых клеток (по отношению к сохранившимся клеткам)	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвые клетки (по отношению к сохранившимся клеткам)
Слизистая языка	22,0 %	5,6 %	49,9 %	8,6 %
Слизистая гортани	77,1 %	1,1 %	59,3 %	5,2 %
Подчелюстные слюнные железы	85,1 %	1,6 %	157,3 %	8,4 %
Подчелюстные лимфатические узлы	147,5 %	51,6 %	142,1 %	4,1 %
Слизистая носовой полости	40,5 %	4,7 %	44,4 %	9,2 %
Слизистая прямой кишки	144,3 %	10,2 %	49,5 %	9,7 %
Слизистая ротовой полости	166,2 %	38,0 %	44,8 %	6,2 %

Таблица 3. Результаты определения антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* нативных образцов и образцов после УФ (Мм менее 50 кДа) методом проточной цитометрии с использованием красителей Eva Green и PI.

Образец	Нативные		после УФ (Мм менее 50 кДа)	
	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвых клеток (по отношению к сохранившимся клеткам)	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвые клетки (по отношению к сохранившимся клеткам)
Слизистая языка	32,1 %	29,3 %	62,1 %	10,8 %
Слизистая гортани	22,1 %	34,0 %	49,0 %	25,8 %
Подчелюстные слюнные железы	9,2 %	66,8 %	17,8 %	18,5 %
Подчелюстные лимфатические узлы	18,4 %	77,3 %	39,1 %	38,7 %
Слизистая носовой полости	7,0 %	12,2 %	24,2 %	14,9 %
Слизистая прямой кишки	21,8 %	69,1 %	31,9 %	30,3 %
Слизистая ротовой полости	76,1 %	54,6 %	83,3 %	7,3 %

как субстрат, а при высвобождении оказывать антимикробное действие. Отмеченное наблюдение подтверждалось тем, что в ультрафильтрах такого эффекта не наблюдалось. Кроме того, в некоторых УФ при удалении высокомолекулярных веществ антимикробная активность возрастала. Нативные экстракты слизистой оболочки гортани и подчелюстных слюнных желез не оказывали существенного антимикробного действия на культуру. УФ в отношении экстрактов слизистых оболочек гортани, ротовой полости и прямой кишки приводили к увеличению активности, в случае лимфатических узлов — не оказывала влияние на активность, а в отношении слизистой оболочки языка и подчелюстных слюнных желез — напротив, снижала.

Определение антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* нативных образцов и образцов после УФ (Мм менее 50 кДа) методом проточной цитометрии с использованием красителя Eva Green и PI представлено в Табл. 3.

Активностью обладали практически все нативные образцы, наибольшее антимикробное действие было отмечено у экстрактов слизистой оболочки носовой полости, доля выживших клеток не превышала 7,0 %. Стоит отметить, что доля сохранившихся мертвых клеток во всех образцах была значительно выше,

чем в эксперименте по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*, что свидетельствует о более высокой активности образцов относительно грамположительных бактерий. УФ в отношении большинства образцов не приводила к увеличению активности.

Заключение

Проведенное исследование антимикробной активности пограничных тканей слизистых оболочек говядины в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий методом проточной цитометрии свидетельствуют, что экстракты слизистых оболочек языка, ротовой и носовой полостей являются наиболее перспективными. Интересным также является наблюдения, обнаруженные в отношении подчелюстных лимфатических узлов и слизистой ротовой. Также в ходе работы была установлена целесообразность применения энзиматической обработки для высвобождения АМП из препробелковых молекул и ультрафильтрации для очистки от менее эффективных высокомолекулярных соединений.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-76-10033).

Introduction

Since ancient times, people have used completely different ways for extending the shelf life of food products: smoking, drying, salting, adding spices, using sugar, fermentation, etc. At present methods of food preservation are classified into physical, chemical and biological [1,2]. Currently, various chemically synthesized preservatives and antioxidants are used (for example, E-200-E-399). Additives are used in all areas of the food industry, but most of them are banned in many countries, including the Russian Federation, because of their insecurity for human health and side effects as a result of constant consumption. Therefore, the problem of finding alternative natural substances for prolonging the shelf life of products is particularly acute.

Recently, the demand of consumers for healthy food products, including those that do not contain synthetic food additives, has been increasing [2]. Currently, commercial natural preservatives such as nisin «Nisaplin» (UK), lysozyme «Clerizym Granulate» (Italy), natamycin «Natamycin» (France), as well as various spices or certain antioxidants are already used [3].

In this regards, natural antimicrobial substances are reasonable perspective. Numerous studies have contributed to the creation of the Antimicrobial Peptide Database [4] containing systematic information about 2818 antimicrobial peptides from the kingdoms of bacteria, fungi, protozoa, archaea, plants and animals.

The most intensive antimicrobial peptides (AMP) study has been observed over the last ten years. α -defensins and cathelicidins were one of the first opened antimicrobial peptides [5], since this list was substantially enlarged and includes magainins [6], histatins [7], azurocicrins [8], spheniscins [9], pleurocidins [10], dermaseptins [11], cecropins [12], melittins [13], and many others.

In Russia, the founders of the study of antimicrobial peptides were such scientists as V. N. Kokryakov. (Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg), O.V. Shamono-va (All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine of A. M. Nikiforov, Saint Petersburg) and T.V. Ovchinnikova (Institute of Bioorganic Chemistry. Academy of M. M. Shemyakina and Y. A. Ovchinnikova RAS, Moscow) [14,15,16,17].

It is known that animal tissues contain a huge number of bioactive compounds with different pharmacological properties [18]. Most of the studied mammalian antimicrobial peptides (AMP) were isolated from neutrophil granulocytes, but they were also found in the small intestine, tongue, myeloid and epithelial cells, albeit in smaller quantities. This fact allows us to consider as a source of antimicrobial substances not only the granular apparatus, but also the tissues of the mucous membranes of mammals, including farm animals. These tissues due to its border position are constantly in contact with a wide range of different biological agents, including pathogenic and opportunistic microorganisms and viruses, agents of fungal nature, and

therefore can potentially contain a set of substances with antimicrobial action.

Particular attention should be paid to the isolation of such proteins and peptides taking into account structure and preservation of biological activity. For a sufficient degree of grinding of border mucous membranes, it is considered appropriate to use the technology of cryo-grinding in several repetitions. According to structure, most antimicrobial substances have alkaline isoelectric point, so it is preferable to use acidic solutions for extraction. In addition, at high ionic strength, they are prone to loss of their biological activity, which is why the use of salt solutions is undesirable. To remove colloidal suspension formed during extraction due to the presence of a large number of connective proteins (collagen and elastin) in the tissues, centrifugation at high speeds of extracts is considered rational [19,20,21]. According to the international database UniProt Protein Database, antimicrobial peptides are contained in a living organism often in the form of preproprotein, containing «prestructural region», signal peptide and mature peptide [3,4], so it is advisable to apply proteolytic enzymes (e.g. trypsin, pepsin, elastase). Ultrafiltration is used quite effectively for molecular weight separation of protein-peptide substances [22]. The material for the manufacture of UF filters, usually inert to protein substances, does not cause their adhesion and inactivation, and the method is quick and easy.

Objects and methods

The objects of the study were the border areas of the mucous membranes of the tongue, larynx, submandibular salivary glands, submandibular lymph nodes, nasal and oral cavities and rectum of beef. Samples taken at the factory JSC «CRROS», Moscow region, Istrinskiy dis., vill. Denezhkino. The activity of the isolated antimicrobial peptides (AMP) were studied in the obtained native extracts after neutralization, in extracts after fermentolysis and ultrafiltrates with a molecular weight less than 50 kDa.

Samples of mucous membranes were extracted with a solution of 10 % acetic acid at a hydromodule of 1:5, stirring speed of 400 rpm, for 5 hours at (4–5) °C at LDU (Labotex, Russia). Then the extracts were centrifuged (Sigma 3K30, Germany) at 15,000 rpm and 4.0 °C, for 5 min, the supernatant was taken. The supernatant was neutralized to pH=6 with a solution of sodium hydroxide with a concentration of 4 mol/l. Next, part of the neutralized extracts were subjected to trypsinolysis (PanReac, activity 328 USP U/mg), part — ultrafiltration on centrifuge ultrafilters Amicon Ultra-4 (50kDa, Millipore). The isolation scheme is clearly shown in Figure 1.

To determine the antimicrobial activity of neutralized native samples and samples after trypsin treatment against *Listeria monocytogenes*, using Eva Green 50 μ l of the sample was mixed with 50 μ l of culture (10^6 cells/ml), incubated overnight in a thermostat at 37 °C. Then to 20 μ l of the mixture 5 μ l of Eva Green was added, 365 μ l of deion-

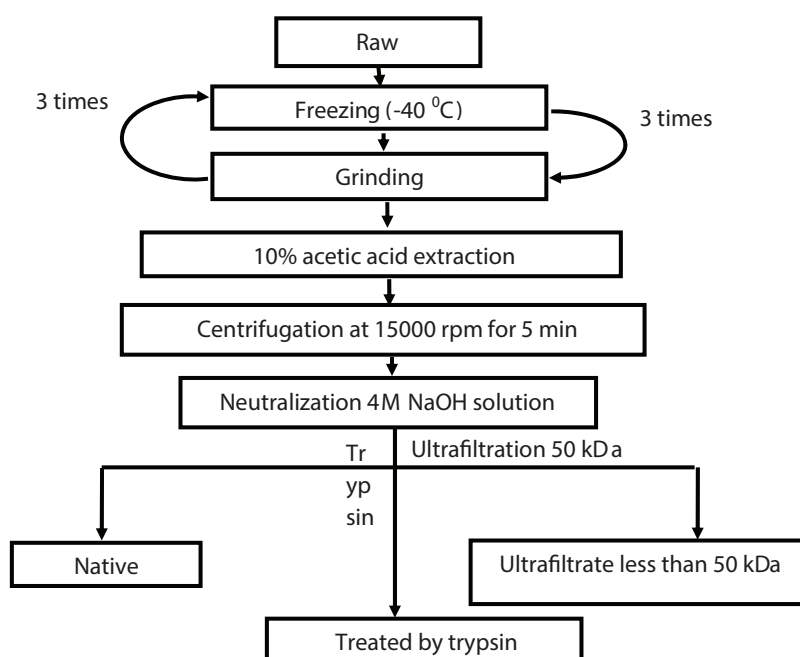


Figure 1. Scheme of antimicrobial peptides (AMP) isolation from animal raw materials

ized water and 10 µl of DMSO (to remove background red fluorescence), incubated in the dark for 10–15 min, living and dead cells were measured on the flow cytometer Guava EasyCyte (MerkMillipore).

To determine the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* neutralized native samples and samples after ultrafiltration (Mm less than 50 kDa) using Eva Green and PI 10 µl of the sample was mixed with 90 µl culture (106 KL/ml), incubated overnight in a thermostat at 37 °C. Then to 20 µl of the mixture 5 µl Eva Green was added, 365 µl of deionized water and 10 µl DMSO (10 µl DMSO to remove the background red fluorescence), incubated in the dark for 10–15 minutes, measured living cells on a flow cytometer Guava EasyCyte (MerkMillipore). 3 µl PI was added to 20 µl of the mixture, 377 µl of 0.9 % sodium chloride solution was added, 10–15 min were incubated in the dark, dead cells were measured on a flow cytometer Guava EasyCyte (MerkMillipore).

Results and discussion

Determination of antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* of native and trypsin-treated samples by flow cytometry using Eva Green dye is presented in Table 1.

Mucous of the rectum and the oral cavity possessed the highest activity, the ratio of living cells decreased to 2.7%, treatment of trypsin in relation to the mucous membranes of the tongue, submandibular salivary glands and lymph nodes led to the increase in activity, in the case of the mucous membranes of the larynx, nasal cavity and rectum — no effect on the activity, and in relation to mucous membrane in oral cavity, on the contrary, reduced.

Determination of antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* of native samples and samples after ultrafiltration (UF) (Mm less than 50 kDa) by flow cytometry using Eva Green and PI is presented in Table 2.

Table 1. Results of antimicrobial activity determination against *Listeria monocytogenes* of native and trypsin-treated samples by flow cytometry using Eva Green dye

Sample	% living cells	
	Native	Treated by trypsin
Control (positive)	92.3 %	
Control (negative)	4.1 %	
The mucosa of the tongue	81.9 %	36.2 %
The mucosa of the larynx	98.8 %	100.0 %
Submandibular salivary glands	82.3 %	11.1 %
Submandibular lymph nodes	62.5 %	44.4 %
The mucosa of the nasal cavity	100.0 %	100.0 %
The mucosa of the rectum	20.8 %	96.4 %
The mucosa of the oral cavity	2.7 %	6.0 %

The mucous membranes of the tongue and nasal cavity were most active, the proportion of surviving cells decreased to 22.0 %. Adding extracts of lymph nodes, mucous membranes of the oral cavity and rectum to the culture lead to the increase in the number of survived cells almost by 2 times, but the proportion of dead cells (stained PI) reached 51.6 % of all cells.

Presumably, this observation is due to the fact that antimicrobial peptides (AMP) are «packed» in a protein molecule, which can be used by microorganisms initially as a substrate, and only after releasing have an antimicrobial effect. The revealed observation was confirmed by the fact that such effect was not observed in ultrafilters. In addition, in some UF when removing high-molecular substances, antimicrobial activity increased. Native extracts of the mucous membrane of the larynx and submandibular salivary glands did not have a significant antimicrobial effect on the culture. UF the larynx, oral cavity and rectum

Table 2. Results of antimicrobial activity determination against *Pseudomonas aeruginosa* of native samples and samples after UF (Mm less than 50 kDa) by flow cytometry using Eva Green and PI dyes.

Sample	Native		After UF (Mm less than 50 kDa)	
	survived cells (in relation to control)	the proportion of dead cells (in relation to the survived cells)	survived cells (in relation to control)	the proportion of dead cells (in relation to the survived cells)
The mucosa of the tongue	22.0 %	5.6 %	49.9 %	8.6 %
Mucosa of the larynx	77.1 %	1.1 %	59.3 %	5.2 %
Submandibular salivary glands	85.1 %	1.6 %	157.3 %	8.4 %
Submandibular lymph nodes	147.5 %	51.6 %	142.1 %	4.1 %
The mucosa of the nasal cavity	40.5 %	4.7 %	44.4 %	9.2 %
The mucosa of the rectum	144.3 %	10.2 %	49.5 %	9.7 %
The mucosa of the oral cavity	166.2 %	38.0 %	44.8 %	6.2 %

Table 3. Results of antimicrobial activity determination in relation to *Staphylococcus aureus* of native samples and samples after UF (Mm less than 50 kDa) by flow cytometry using Eva Green and PI dyes.

Sample	Native		After UF (Mm less than 50 kDa)	
	survived cells (in relation to control)	the proportion of dead cells (in relation to the survived cells)	survived cells (in relation to control)	the proportion of dead cells (in relation to the survived cells)
The mucosa of the tongue	32.1 %	29.3 %	62.1 %	10.8 %
The mucosa of the larynx	22.1 %	34.0 %	49.0 %	25.8 %
Submandibular salivary glands	9.2 %	66.8 %	17.8 %	18.5 %
Submandibular lymph nodes	18.4 %	77.3 %	39.1 %	38.7 %
The mucosa of the nasal cavity	7.0 %	12.2 %	24.2 %	14.9 %
The mucosa of the rectum	21.8 %	69.1 %	31.9 %	30.3 %
The mucosa of the oral cavity	76. %	54.6 %	83.3 %	7.3 %

extracts led to an increase in activity, in the case of lymph nodes — did not affect the activity, and in respect of the mucous membrane of the tongue and submandibular salivary glands — on the contrary, reduced.

Determination of antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* of native samples and after UF (Mm less than 50 kDa) by flow cytometry using Eva Green and PI is presented in Table 3.

Almost all native samples possessed antimicrobial activity, the greatest antimicrobial effect was observed in extracts of the nasal mucosa, the proportion of surviving cells did not exceed 7.0 %. It is worth noting that the proportion of dead cells in all samples was significantly higher than in the experiment with respect to *Pseudomonas aeruginosa*, which indicates a higher activity of samples with respect to gram-positive bacteria. UF for most of the samples did not lead to increased activity.

Conclusion

The study of antimicrobial activity of substances included in the border tissues of bovine mucous membranes against gram-positive and gram-negative bacteria by flow cytometry suggests that the extracts of the mucous membranes of the tongue, oral and nasal cavities are the most promising. Interesting is also the observations found in respect of submandibular lymph nodes and oral mucosa. Application of enzymatic treatment for releasing the antimicrobial peptides (AMP) from preproprotein and ultrafiltration for purification from less effective high-molecular compounds were also reasonable.

Acknowledgements

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 17-76-10033).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Лукинова, Е.А., Котенкова, Е.А., Макаренко, А.Н. (2017). Анти-микробные вещества: альтернативный подход к продлению сроков хранения. *Теория и практика переработки мяса*, 2(3), 4–20.
2. Асланова, М.А., Дыдыкин, А.С., Федюлова, Л.В., Деревицкая, О.К. (2017). Влияние электромагнитной обработки на окислительную стабильность и микробиологическую безопасность мясных полуфабрикатов. *Теория и практика переработки мяса*, 2(3), 39–48.
3. Государственная политика Российской Федерации в области здорового питания. [Электронный ресурс: URL:

- <https://rmapo.ru/medical/58-osnovy-gosudarstvennoy-politiki-rossiyskoy-federacii-v-oblasti-zdorovogo-pitaniya-naseleniya-na-period-do-2020-goda.html> Дата обращения: 04.07.2018 г.]
4. The Antimicrobial Peptide Database [Электронный ресурс: URL: <http://aps.unmc.edu> Дата обращения: 08.06.2018]
 5. Кулакова, Е.В., Елизарова, В.М., Пампура, А.Н. (2012). Эндогенные антимикробные полипептиды — факторы неспецифической защиты организма. *Российский стоматологический журнал*, 6, 42–45.

6. Zasloff, M., Martin, B., Chen, H. — C. (1988). Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(3), 910–913.
7. Ge, Y., Yan, H., Hui, B., Ni, Y., Wang, S., Cai, T. (2002). Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 685–689.
8. Shi, J. (1996). Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother*, 40(1), 115–121.
9. Thouzeau, C., Le Maho, Y., Froget, G., Sabatier, L., Le Bohec, C. Hoffmann, J.A., Bulet, P. (2003). Spheniscins, Avian β -Defensins in Preserved Stomach Contents of the King Penguin, Aptenodytes patagonicus. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51053–51058.
10. Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 12008–12013.
11. Mor, A., Nicolas, P. (1994). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *European Journal of Biochemistry*, 219(1–2), 145–154.
12. Hee Lee, I.N., Cho, Y., Lehrer, R.I. (1997). Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity*, 65(7), 2898–2903.
13. Wilcox, W., Eisenberg, D. (1992). Thermodynamics of melittin tetramerization determined by circular dichroism and implications for protein folding. *Protein Science*, 1(5), 641–653.
14. Овчинникова, Т.В. (2011). Структурно-функциональное исследование природных пептидных антибиотиков. Диссертация докт. хим. наук. — М, Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. — 68 с.

15. Кокряков, В.Н. (1995). Физико-химические и функциональные свойства антимикробных белков и пептидов. Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб, НИИ экспериментальной медицины РАМН. — 48 с.
16. Шамова, О.В. (1995). Физико-химическая характеристика и функциональные свойства дефенсинов и протегинов. Автореф. дис. канд. биол. наук. СПб, НИИ экспериментальной медицины РАМН. — 24 с.
17. Шамова, О.В. (2013). Молекулярно-клеточные основы реализации биологической активности антимикробных пептидов лейкоцитов. Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб, НИИ экспериментальной медицины РАМН. — 48 с.
18. Василевская, Е.Р., Федуллова, Л.В. (2015). Животное сырье как источник природных регуляторов иммунитета. *Актуальная биотехнология*, 3(14), 97–98.
19. Жаркова, М.С. (2016). Сочетанное действие белков и пептидов системы врожденного иммунитета и соединений различной химической природы в реализации их антибиотических свойств. Автореф. дис. канд. биол. наук. Санкт-Петербург, НИИ экспериментальной медицины РАМН. — 24 с.
20. Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377–5392.
21. Przybylski, R., Firdaus, L., Châtaigné, G., Dhulster, P., Nedjar, N. (2016). Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chemistry*, 211, 306–311.
22. Keska, P., Stadnik, J. (2017). Antimicrobial peptides of meat origin — an in silico and in vitro analysis. *Protein and Peptide Letters*, 24(2), 165–173.

REFERENCES

1. Lukinova, E.A., Kotenkova, E.A., Makarenko, A.N. (2017). Antimicrobial substances: an alternative approach to the extension of shelf life. *Theory and practice of meat processing*, 2(3), 4–20. (In Russian)
2. Aslanova, M.A., Dydykin, A.S., Fedulova, L.V., Derevitskaya, O.K. (2017). An effect of the electromagnetic treatment on oxidative stability and microbiological safety of meat semi-prepared products. *Theory and practice of meat processing*, 2(3), 39–48. (In Russian)
3. State policy of the Russian Federation in the field of healthy nutrition. [Electronic resource: URL: <https://rmapo.ru/medical/58-osnovy-gosudarstvennoy-politiki-rossiyskoy-federacii-v-oblasti-zdorovogo-pitaniya-naseleniya-na-period-do-2020-goda.html> Access data: 04.07.2018]. (In Russian)
4. The Antimicrobial Peptide Database [Electronic resource: URL: <http://aps.unmc.edu> Access data: 08.06.2018].
5. Kulakova, E.V., Elizarova, V.M., Pampura, A.N. (2012). Endogenous antimicrobial polypeptides — factors of nonspecific protection of the organism. *Rossiiskii Stomatologicheskii Zhurnal*, 6, 42–45. (In Russian)
6. Zasloff, M., Martin, B., Chen, H. — C. (1988). Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(3), 910–913.
7. Ge, Y., Yan, H., Hui, B., Ni, Y., Wang, S., Cai, T. (2002). Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 685–689.
8. Shi, J. (1996). Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother*, 40(1), 115–121.
9. Thouzeau, C., Le Maho, Y., Froget, G., Sabatier, L., Le Bohec, C. Hoffmann, J.A., Bulet, P. (2003). Spheniscins, Avian β -Defensins in Preserved Stomach Contents of the King Penguin, Aptenodytes patagonicus. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51053–51058.
10. Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 12008–12013.
11. Mor, A., Nicolas, P. (1994). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *European Journal of Biochemistry*, 219(1–2), 145–154.

12. Hee Lee, I.N., Cho, Y., Lehrer, R.I. (1997). Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity*, 65(7), 2898–2903.
13. Wilcox, W., Eisenberg, D. (1992). Thermodynamics of melittin tetramerization determined by circular dichroism and implications for protein folding. *Protein Science*, 1(5), 641–653.
14. Овчинникова, Т.В. (2011). Structural and functional study of natural peptide antibiotics. Dissertation for the scientific degree of Doctor of Chemical Sciences. — М: Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry. — 68 p. (In Russian)
15. Kokryakov, V.N. (1995). Physico-chemical and functional properties of antimicrobial proteins and peptides. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences. St. Petersburg: Research Institute of Experimental Medicine RAMS. — 48 p. (In Russian)
16. Shamova, O.V. (1995). Physico-chemical characteristics and functional properties of defensins and proteasins. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences. St. Petersburg, Research Institute of Experimental Medicine RAMS. — 24 p. (In Russian)
17. Shamova, O.V. (2013). Molecular-cellular bases of realization of biological activity of antimicrobial peptides of leukocytes. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences. St. Petersburg: Research Institute of Experimental Medicine RAMS. — 48 p. (In Russian)
18. Vasilevskaya, E.R., Fedulova, L.V. (2015). Animal raw materials as a source of natural regulators of immunity. *Actual biotechnology*, 3(14), 97–98. (In Russian)
19. Zharkova, M.S. (2016). Combined action of proteins and peptides of the system of innate immunity and compounds of different chemical nature in the realization of their antibiotic properties. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences. St. Petersburg: Research Institute of Experimental Medicine RAMS. — 24 p. (In Russian)
20. Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377–5392.
21. Przybylski, R., Firdaus, L., Châtaigné, G., Dhulster, P., Nedjar, N. (2016). Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chemistry*, 211, 306–311.
22. Keska, P., Stadnik, J. (2017). Antimicrobial peptides of meat origin — an in silico and in vitro analysis. *Protein and Peptide Letters*, 24(2), 165–173.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Лукинова Екатерина Александровна — старший лаборант, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-92-11
E-mail: e.lukinova@fncps.ru

Котенкова Елена Александровна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-92-11
E-mail: e.kotenkova@fncps.ru
*автор для переписки

Полищук Екатерина Константиновна — старший лаборант, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-92-11
E-mail: kat.1997@mail.ru

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 20.07.2018

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Ekaterina A. Lukinova — senior laboratory 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: e.lukinova@fncps.ru

Elena A. Kotenkova — candidate of technical sciences, senior 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.: +7-495-676-92-11
E-mail: e.kotenkova@fncps.ru
*corresponding author

Ekaterina K. Polischuk — senior laboratory 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: kat.1997@mail.ru

Contribution

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

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 20.07.2018

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ, ФОРМИРУЮЩИХ КОРРЕГИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ИННОВАЦИОННЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Вострикова Н.Л.^{1,*}, Чернуха И.М.¹, Хвостов Д.В.^{1,2}

¹ Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

² Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, Московская область, Россия

Ключевые слова: протеомика, двумерный электрофорез, биомаркеры, масс-спектрометрия

Аннотация

Одним из направлений решения стоящих перед отраслью вопросов качества питания является разработка стандартизированных и аттестованных методик, связанных с проведением глубоких исследований биохимических показателей качества и безопасности мяса и мясных продуктов. Мировая лабораторная практика в области качества и безопасности продуктов питания свидетельствуют о постоянном расширении списка контролируемых показателей пищевого сырья и продукции. Важной особенностью современного периода в развитии биомедицинских и биотехнологических исследований является внедрение целого комплекса постгеномных технологий, в основе которых лежит системный подход к изучению особенностей функционирования протеома млекопитающего при различных физиологических и патологических состояниях, в том числе при формировании и развитии алиментарно-зависимых патологий. В связи с этим проблема многостороннего изучения пищевых продуктов, в частности их идентификация, является наиболее актуальной, поскольку современная технология их производства претерпела существенные изменения и требует разработки «исходящих» режимов обработки. Они касаются исходного сырья и вспомогательных материалов, используемых на всех этапах производства продукции. Это и новые технологии производства белковых продуктов из растительного сырья, а также введение в продовольственное сырье и продукты питания пищевых добавок искусственного происхождения и избыточное внесение добавок растительного и животного может стать причиной фальсификации продуктов, а также сказаться на здоровье потребителя. Оценка качества пищевых продуктов включает контроль компонентов готовых изделий. Наиболее сложно определить долю мышечнотканного белка в многокомпонентных мясных продуктах, прошедших термическую обработку. Поэтому в практике при оценке качества пищевых продуктов возникает необходимость идентификации его реального состава в соответствии с декларируемым нормативным документам. В настоящее время перспективным направлением научных исследований в области определения состава готовых пищевых продуктов является выделение биомаркеров различных компонентов. В связи с этим актуальным является разработка методологии идентификации биохимических изменений пищевого сырья под действием технологических факторов с использованием современных методов исследования. В данной работе представлен обзор методологии анализа белков и пептидов, включающий последние технологии, которые приобретают всю большую актуальность.

Review paper

METHODOLOGICAL ASPECTS OF IDENTIFICATION OF TISSUE-SPECIFIC PROTEINS AND PEPTIDES FORMING THE CORRECTIVE PROPERTIES OF INNOVATIVE MEAT PRODUCTS

Natal'ya L. Vostrikova^{1,*}, Irina M. Chernukha¹, Daniil V. Khvostov²

¹ V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Scientific Center of Biomedical Technology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow region, Russia

Key words: proteomics, two-dimensional electrophoresis, biomarkers, mass spectrometry

Abstract

One of the ways to address the food quality issues facing the industry is the development of standardized and certified methods related to the conduct of in-depth studies of biochemical indicators of quality and safety of meat and meat products. The world laboratory practice in the field of food quality and safety shows a constant expansion of the list of controlled indicators of food raw materials and products. An important feature of the modern period in the development of biomedical and biotechnological research is the introduction of a whole complex of postgenomic technologies, which are based on a systematic approach to the study

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

FOR CITATION: Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Khvostov D.V. Methodological aspects of identification of tissue-specific proteins and peptides forming the corrective properties of innovative meat products. Theory and practice of meat processing. 2018;3(3): 36-55 (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-36-55

of the functioning of the mammalian proteome in various physiological and pathological conditions, including the formation and development of alimentary-dependent pathologies. In this regard, the problem of multilateral study of food products, in particular their identification, is the most relevant, because the modern technology of their production has undergone significant changes and requires the development of “gentle” processing modes. They concern raw materials and auxiliary materials used at all stages of production. This and new technologies of production of protein products from plant raw materials, as well as the introduction of food raw materials and food additives of artificial origin and the excess introduction of additives of plant and animal origin can cause falsification of products, as well as affect the health of the consumer. Food quality assessment includes the control of components of finished products. It is most difficult to determine the proportion of muscle protein in multi-component meat products that have undergone heat treatment. Therefore, in practice, when assessing the quality of food products, there is a need to identify its real composition in accordance with the declared normative documents. Currently, a promising area of research in the field of determining the composition of finished food is the selection of biomarkers of various components. Therefore, it is important to develop a methodology for the identification of biochemical changes in food raw materials under the influence of technological factors using modern research methods. This paper provides an overview of the protein and peptide analysis methodology, including the latest technologies that are becoming increasingly important.

Введение

Белки представляют собой крупные биомолекулы или макромолекулы, состоящие из одной или нескольких длинных цепей аминокислотных остатков. Белки выполняют широкий спектр функций внутри организмов, включая катализирующие метаболические реакции, репликацию ДНК, реакцию на раздражители и перенос молекул из одного места в другое. Белки отличаются друг от друга в первую очередь последовательностью аминокислот, которая продиктована нуклеотидной последовательностью их генов. Как правило, это приводит к сгибанию белка в специфическую трехмерную структуру, которая определяет его активность [1]. Линейная цепь аминокислотных остатков называется полипептидом. Белок содержит, по меньшей мере, один длинный полипептид. Короткие полипептиды, содержащие менее 20–30 остатков, редко считаются белками и обычно называются пептидами или иногда олигопептидами. Отдельные аминокислотные остатки соединены вместе пептидными связями и соседними аминокислотными остатками. Последовательность аминокислотных остатков в белке определяется последовательностью гена, который кодируется в генетическом коде. В общем, генетический код указывает 20 стандартных аминокислот; однако в некоторых организмах генетический код может включать селеноцистеин и в некоторых пирролизин. Вскоре после или даже во время синтеза часто происходят посттрансляционные модификации остатков в белке, которые изменяют физические и химические свойства, складывание, стабильность, активность и, в конечном счете, функцию белков [2]. Иногда белки содержат не пептидные группы, которые можно назвать протезными группами или кофакторами. Белки могут также работать вместе для достижения определенной функции, и они часто ассоциируются с образованием стабильных белковых комплексов [3,4].

После образования белки существуют только в течение определенного периода времени, а затем деградируют и перерабатываются аппаратом клетки через процесс белкового цикла. Продолжительность жизни

белка измеряется периодом его полураспада и охватывает широкий диапазон. Они могут существовать в течение нескольких минут или лет со средней продолжительностью жизни 1–2 месяца в клетках млекопитающих. Аномальные или несогласованные белки деградируют быстрее благодаря тому, что они подвергаются разрушению, либо из-за неустойчивости [5].

Как и другие биологические макромолекулы, такие как полисахариды и нуклеиновые кислоты, белки являются важными частями организмов и участвуют практически во всех процессах в клетках. Многие белки являются ферментами, которые катализируют биохимические реакции и являются жизненно важными для метаболизма. Белки также имеют структурные или механические функции: актин и миозин в мышцах, белки в цитоскелете, которые образуют систему микрофиламентов, поддерживающих форму клеток. Другие белки важны в клеточной передаче сигналов, иммунных реакциях, клеточной адгезии и клеточном цикле. У животных в рационе необходимы белки, для обеспечения незаменимыми аминокислотами, которые невозможно синтезировать. Пищеварение разрушает белки для использования в метаболизме [6].

Чтобы выполнить свою функцию, белки взаимодействуют с другими веществами с другими веществами на молекулярной или ионном уровне или другими белками. Белки взаимодействуют в различных контекстах и с разными результатами. Некоторые белки активируют или дезактивируют другие белки путем связывания с ними или путем (де-) фосфорилирования их. В процессе фосфорилирования, фосфатную группу добавляют (или удаляют) из белка, что активирует или дезактивирует белок. Другие белки связываются друг с другом, создавая так называемые белковые комплексы. Они имеют важные роли во всей клетке, например, в репликации ДНК. Другой класс белков связывается друг с другом для создания структурных комплексов, которые передают клетке свою трехмерную структуру. Все эти взаимодействия, являются центральной частью функционирования клетки. Понимание этих основных взаимодействий имеет жизненно важное

значение для понимания внутренней работы жизнедеятельности организма.

Тканеспецифическая экспрессия генов может приводить к наличию или отсутствию определенных белковых взаимодействий и комплексов, что приводит к глубоким функциональным различиям биологических процессов в тканях [7].

Понимание характера этих взаимодействий важно для изучения того, как и почему работают клетки. Взаимодействия между всеми белками в клетке составляют так называемое белково-белковое взаимодействие (Protein-protein interactions-PPI) сети. Не все белки присутствуют во всех клетках и типах тканей, поэтому белковые взаимодействия ограничены клеточными и тканевыми типами, где оба взаимодействующих белка присутствуют. Эти тканезависимые взаимодействия образуют тканеспецифические PPI (TSPPI) [8].

С этой целью изучают методологические аспекты анализа и выбирают, или разрабатывают эффективные алгоритмы, которые показывают наиболее достоверные результаты. Кроме того, изучают основные свойства TSPPI, чтобы получить представление о структуре взаимодействий, а также свойства определенных групп белков. Наконец, используют алгоритмы кластеризации с целью выявления тканеспецифических функциональных модулей в рамках TSPPIs [9].

Значительный интерес представляет изучение механизмов образования веществ белковой и пептидной природы, обуславливающих биокорректирующие и качественные характеристики путей их биосинтеза [10].

Все больше внимания уделяется биоинформатике как инструменту изучения протеома, с точки зрения гипотетического наличия в нем, тех или иных биологически активных пептидов и белков-маркеров. Согласно мировым базам данных в мышечных белках продуктивных животных содержатся аминокислотные последовательности, обладающие различными биологическими свойствами [11].

Основная часть

Подходы к изучению белков

Активность и структуры белков можно исследовать *in vitro*, *in vivo* и *in silico*. Исследования *in vitro* очищенных белков в контролируемых средах полезны для изучения того, как белок выполняет свою функцию: например, исследования кинетики ферментов, выявляют химический механизм каталитической активности фермента и его относительное сродство к различным возможным молекулам субстрата. Напротив, эксперименты *in vivo* могут предоставить информацию о физиологической роли белка в контексте клетки или даже всего организма. В исследованиях *in silico* используются вычислительные методы для изучения белков.

Изучение белков *in vivo* часто связано с синтезом и локализацией белка в клетке. Очень часто не ясна специфичность того, как белки нацелены на определенные органеллы или клеточные структуры, хотя известно о многих синтезированных в цитоплазме внутриклеточных белках, связанных с мембраной или секретируемых белках в эндоплазматическом ретикулуме [4]. Полезный метод оценки клеточной локализации использует генную инженерию для экспрессии в клетке слитого белка или химеры, состоящей из природного белка, представляющего интерес, связанного с «репортером», таким как зеленый флуоресцентный белок (GFP) [12]. Положение слитого белка в клетке может быть чисто и эффективно визуализировано с использованием микроскопии [13].

Существуют экспериментальные методы, например, для обнаружения, выделения и очистки белков, а также для расшифровки структуры и функций, часто требуется очистки исходного белка. Вычислительные методы обычно используют компьютерные программы для анализа белков. Однако многие экспериментальные методы (например, масс-спектрометрия) требуют вычислительного анализа необработанных данных.

Генетические методы

Экспериментальный анализ обычно требует экспрессии и очистки белков. Выражение достигается путем манипулирования ДНК, которая кодирует, представляющий интерес белок. Следовательно, анализ белка обычно требует методов ДНК, особенно клонирования. Некоторые белки никогда не были непосредственно секвенированы, однако, путем перевода кодонов из известных последовательностей мРНК в аминокислоты с помощью метода, известного как «концептуальная трансляция», было проанализировано большинство белковых молекул. Сайт-направленный мутагенез избирательно вводит мутации, которые изменяют структуру белка. Функция частей белка может быть лучше понята путем изучения изменения фенотипа в результате этого воздействия. Белковые спайки получают путем вставки протеиновых меток, таких как His-tag, для получения модифицированного белка, который легче отслеживать. Примером этого может служить GFP-Snf2H меченых комплексов (хроматин-ремоделирование), который состоит из белка, связанного с зеленой флуоресцентной меткой [14].

Анализ ДНК-аллелей может быть идентифицирован как связанный с болезненными состояниями, например, при вычислении оценки LOD, разработанной Ньютоном Мортонем. Она представляет собой статистический тест, который часто используется для анализа сцепления в популяциях человека, животных и растений. Оценка LOD сравнивает вероятность получения тестовых данных, если эти два локуса действительно связаны, с вероятностью наблюдения

случайных событий. Позитивные оценки LOD благоприятствуют наличию связи, тогда как отрицательные оценки LOD указывают на то, что привязка менее вероятна. Компьютеризированный анализ оценки LOD — это простой способ анализа сложных семейных родословных, чтобы определить связь между менделевскими чертами (или между признаком и маркером, или двумя маркерами) [15].

Существуют и другие возможности. Например, иммуногистохимия обычно использует антитело к одному или нескольким представляющим интерес белкам, которые конъюгированы с ферментами, давая либо люминесцентные, либо хромогенные сигналы, которые можно сравнить между образцами, что позволяет получить информацию о локализации. Другим применимым методом является кофракционирование в градиентах сахарозы (или другого материала) с использованием изопикнического центрифугирования [16].

Через другое применение в области генной инженерии, известное как сайт-направленный мутагенез, исследователи могут изменять последовательность белка и, следовательно, его структуру, клеточную локализацию и восприимчивость к регуляции. Этот метод даже позволяет включить неестественные аминокислоты в белке с использованием модифицированных тРНК [17] и рациональный дизайн новых белков с новыми свойствами [18].

Протеомика

К основным экспериментальным методам протеомики относятся двумерный электрофорез [19], который дает возможность разделять большое количество белков, масс-спектрометрию, что позволяет быстро идентифицировать белки и секвенировать пептиды с высокой пропускной способностью (чаще всего после переваривания в геле), белковые микрочипы, которые позволяют обнаруживать относительные уровни большого количества белков, присутствующих в клетке, и двухгибридный скрининг, который позволяет систематически исследовать белок-белковые взаимодействия. Систематическая попытка определить структуры белков, известна как структурная протеомика [20,21].

Биоинформатика

Для анализа структуры, функций и эволюции белков был разработан широкий спектр вычислительных методов.

Развитие таких инструментов было обусловлено большим количеством геномных и протеомных данных, доступных для различных организмов, включая человеческий геном. Экспериментально изучать все белки просто невозможно, поэтому лишь немногие из них подвергаются лабораторным экспериментам, а вычислительные инструменты используются для экстраполяции аналогичных белков. Такие гомоло-

гичные белки могут быть эффективно идентифицированы в отдаленных родственниках путем выравнивания последовательностей. Геномные и генные последовательности могут быть различными инструментами для определенных свойств. Инструменты профилирования последовательности могут найти сайты ферментов рестрикции и предсказать вторичные структуры. Филогенетические «деревья» могут быть построены, и эволюционные гипотезы развиваются с использованием специального программного обеспечения, такого как ClustalW, относительно происхождения современных организмов и выражаемых ими генов. Поле биоинформатики теперь незаменимо для анализа генов и белков.

Определение структуры

Обнаружение третичной структуры белка или четвертичной структуры его комплексов может дать важные сведения о том, как белок выполняет свою функцию. Общие экспериментальные методы определения структуры включают рентгеновскую кристаллографию и ЯМР-спектроскопию, которые могут генерировать информацию при атомном разрешении. Тем не менее, эксперименты ЯМР могут предоставить информацию, из которой можно оценить подмножество расстояний между парами атомов, а окончательные возможные конформации белка определяются путем решения проблемы геометрии расстояния. Двойная поляризационная интерферометрия является количественным аналитическим методом для измерения общей конформации белка и конформационных изменений из-за взаимодействий или другого стимула. Циркулярный дихроизм — еще один лабораторный метод определения внутреннего β -листового/ α -спирального состава белков. Криоэлектронная микроскопия используется для получения структурной информации меньшего разрешения об очень больших белковых комплексах, включая собранные вирусы, вариант, известный как электронная кристаллография, также может давать информацию с высоким разрешением в некоторых случаях, особенно для двумерных кристаллов мембранных белков. Разрешенные структуры обычно депонируются в Банке данных о белках (PDB), доступном ресурсе, из которого можно получить структурные данные о тысячах белков в виде декартовых координат для каждого атома в белке.

Методы прогнозирования структуры белка пытаются обеспечить способ создания правдоподобной структуры для белков, структуры которых экспериментально не определены [22,23].

Хроматографические методы

Наиболее универсальным методом определения чистоты пептидов и белков является обращенно-фазовая хроматография (ОФ ВЭЖХ), основанная на использовании широкого спектра гидрофобных не-

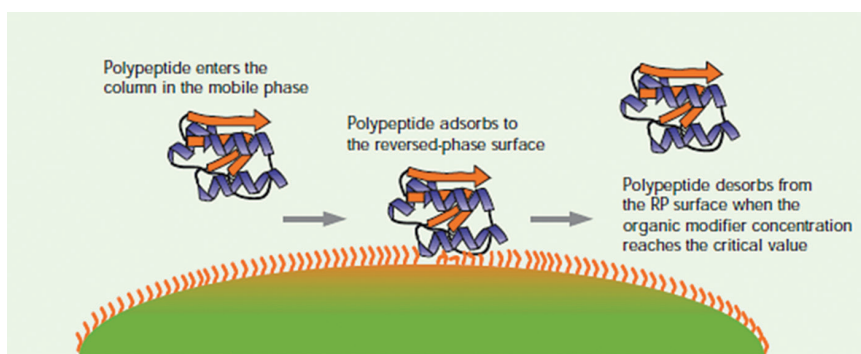


Рис. 1. «Гидрофобная нога» полипептида адсорбируется на гидрофобную поверхность материала с обращенной фазой, где он остается до тех пор, пока концентрация органического модификатора не повысится до критической концентрации [27].

подвижных фаз [24]. Для разделения компонентов лекарственных средств пептидной и белковой природы чаще остальных используются обращенные фазы с использованием силикагеля с привитыми алкильными группами C8 и C18, со средними размерами пор 300 Å. Элюирование лекарственных средств пептидной или белковой структуры или их фрагментов, полученных в результате ферментативного расщепления, в ОФ ВЭЖХ, в основном проводится в режиме градиентного элюирования при pH=2–3 при комнатной температуре, поскольку при повышении температуры возможна частичная или полная денатурация белка, что также влияет на хроматографическую подвижность [25,26].

Понимание механизма взаимодействия полипептидов с поверхностью с обращенной фазой важно для понимания разделения их RP-HPLC. Разделение малых молекул связано с непрерывным разделением их между подвижной и гидрофобной неподвижной фазами. Однако полипептиды слишком велики для разделения на гидрофобной фазе; они адсорбируются на гидрофобной поверхности после входа в колонку и остаются адсорбированными до тех пор, пока концентрация органического растворителя не достигнет критической концентрации, необходимой для десорбции (Рис. 1). Затем они десорбируются и, слегка взаимодействуя с поверхностью, сходят с колонки [27].

Полипептиды можно рассматривать как «сидящие» на неподвижной фазе, причем большая часть молекулы подвергается воздействию подвижной фазы и только часть молекулы — «гидрофобный хвост» — в контакте с обращенной фазой. ОФ-ВЭЖХ отделяет полипептиды на основе тонких различий в «гидрофобном хвосте» отделяемого полипептида. Различия в «гидрофобном хвосте» обусловлены различиями в аминокислотных последовательностях и различиями в конформации [27].

Методы масс-спектрометрии

В настоящее время высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (МС) является одним из самых распространенных методов в исследованиях пептидов и белков [28,29].

Недавние успехи иллюстрируют роль протеомики на основе масс-спектрометрии как незаменимого инструмента для систем молекулярной и клеточной биологии и для новых областей. К ним относятся изучение белково-белковых взаимодействий с помощью аффинно-зависимых изоляций в малом и широко распространенном масштабе, картирование многочисленных органелл, параллельное описание генома паразита малярии и формирование количественных профилей белков у разных видов. Можно ожидать, что способность масс-спектрометрии идентифицировать и, все чаще, количественно определять тысячи белков из сложных образцов, может широко влиять на биологию и медицину.

Масс-спектрометрические измерения проводятся в газовой фазе на заряженных ионах. По определению, масс-спектрометр состоит из источника ионов, масс-анализатора, который измеряет отношение массы к заряду (m/z) ионизированных аналитов и детектор, который регистрирует количество ионов при каждом значении m/z .

В настоящее время в исследованиях протеомики используются четыре основных типа массового анализатора. Это анализаторы ионной ловушки, времени пролета (TOF), квадрупольного и Фурье-ионного циклотронного (FT-MS). Они отличаются друг от друга по дизайну и производительности, каждый из которых обладает собственной силой и слабостью. Эти анализаторы могут быть автономными или, в некоторых случаях, объединены в тандеме, чтобы воспользоваться преимуществами каждого из них [30].

Для достижения разделения масс могут применяться три разных принципа: разделение на основе времени пролета (TOF MS), разделение квадрупольными электрическими полями, генерируемыми металлическими стержнями (квадрупольная МС), или разделение путем селективного выброса ионов из трехмерного поля захвата (ионная ловушка или электронно-циклотронного резонанса Фурье). Для структурного анализа, такого как пептидное секвенирование, проводят две стадии масс-спектрометрии в тандеме (тандемная масс-спектрометрия или MS/MS), что может быть выполнено с использованием одного и того же принципа

разделения дважды или путем объединения двух разных принципов разделения MS. И MALDI, и электрораспыление могут быть связаны с любым из этих трех методов разделения. Тот факт, что MALDI производит короткие всплески ионов в вакууме, а электрораспыление создает непрерывный пучок ионов в атмосфере, как правило, приводит к соединению MALDI с TOF MS и электрораспыление с квадруполом и ионно-захватывающей ловушкой [29].

Идентификация пептидов и белков

Одной из важнейших задач определения качества лекарственных средств пептидной и белковой структуры является идентификация белков. Белки идентифицируются главным образом по их аминокислотной последовательности. При масс-спектрометрическом анализе пептидов и белков различают три подхода.

Наиболее широко применяемым методом по-прежнему является протеомика «снизу вверх», где белок переваривается в пептиды, которые могут быть эффективно проанализированы с использованием широкого спектра инструментов LC-MS или MALDI-TOF-MS. Подготовка образца для экспериментов по методу «снизу вверх» требует нескольких трудоемких этапов перехода от белка к пептидному уровню. Наиболее важным шагом в таких подходах является переваривание белка, которое часто является узким местом, так как занимает много времени. Следовательно, значительное увеличение пропускной способности может быть достигнуто путем ускорения процесса пищеварения. Современные методы позволяют сократить время переваривания от ночной инкубации (~ 15 часов) до минут или даже секунд. Это продвижение также делает возможным интеграцию в онлайн-системы, тем самым уменьшая количество утомительных шагов обработки образцов и риск потери образца [31]. В этом разделе дается обзор имеющихся в настоящее время стратегий пищеварения и последних изменений в ускорении процесса пищеварения.

Переваривание белка, как ферментативно, так и неферментативно, является важным и (почти) незаменимым инструментом идентификации, характеристики и количественной оценки протеина с помощью стратегий протеомики [32]. Протеомика играет жизненно важную роль в основных областях исследований, включая обнаружение биомаркеров болезни и биосистем, и, как таковая, значительно способствует пониманию биологических процессов, которые необходимы для жизни [33].

Выбор подхода протеомики должен основываться на типе вопроса, на который нужно ответить. Глобальная протеомика, такая как нахождение биомаркера в очень сложном образце, касается идентификации часто малочисленного неизвестного белка, который присутствует в сложном образце с широким динамическим диапазоном белков. Для этого требуется совсем другой подход, чем целевой анализ белка, например, характеристика состояний посттрансляционной модификации (ПТМ), где требуется подробное исследование и полное картирование последовательности известного белка для локализации, возможно, малообеспеченных ПТМ. Кроме того, (классы) белков со специальными характеристиками, могут требовать особой подготовки для них.

Подходы в протеомике можно различать по уровню, на котором проводится анализ (Рис. 2). Достижения в области масс-спектрометрии (МС) теперь позволяют напрямую анализировать белки. В таком эксперименте «сверху вниз» очищенные белки детектируются интактными и после фрагментации с использованием ударно-активированной диссоциации (CAD), диссоциации электрон-захвата (ECD) или диссоциации переноса электронов (ETD), обеспечивая информацию об интактной массе белка и аминокислотной последовательности [34,35]. Анализ нижних нитей интактных белков сводит к минимуму подготовку проб и сохраняет информацию, которая иногда теряется в других стратегиях протеомики,

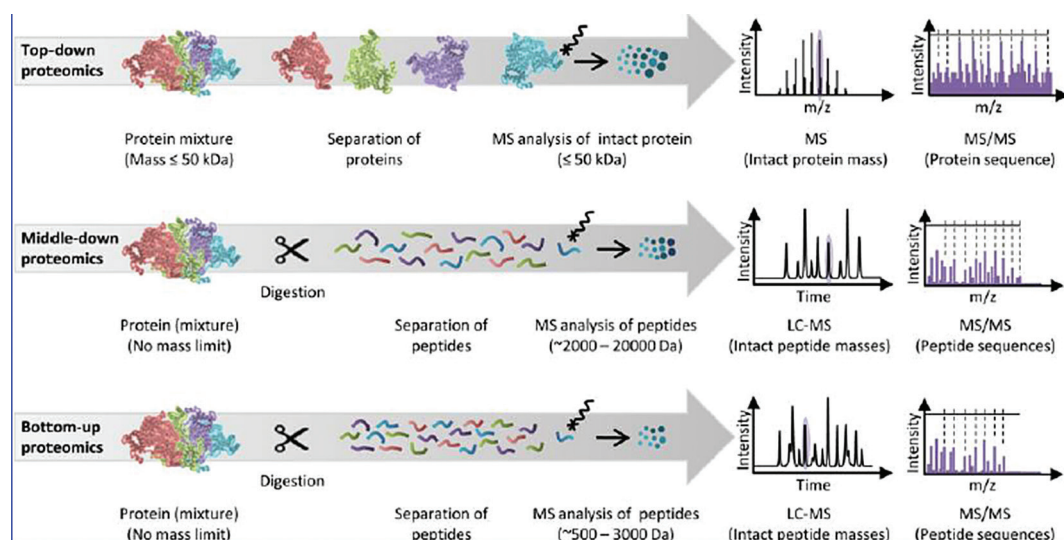


Рис. 2. Обзор подходов протеомики [31]

таких как связывание нескольких ПТМ, но относительно нечувствительна [36]. Из-за большого размера аналитов требования к приборам MS с точки зрения разрешения и массовой точности осуществляются только высокопроизводительными масс-спектрометрами, такими как ионно-циклотронный резонанс Фурье MS (FTICR-MS) и Orbitrap MS [37]. Тем не менее, интактный анализ белков также проводился с использованием более доступных инструментов, таких как тандемный квадруполь и квадрупольный времяпролетный масс детектор (QTOF) MS. На практике массовый диапазон белков, который может быть проанализирован с использованием протеомики «сверху вниз», ограничен до ~ 50 кДа, таким образом, примерно 500 аминокислот [38]. В противном случае секвенируются только C- и N-концы [39,40]. Несмотря на очевидные преимущества протеомики «сверху вниз», необходима дальнейшая разработка инструментария MS, прежде чем она станет основной технологией.

подавляющее большинство экспериментов с протеомикой предполагает процедуру переваривания белка в пептиды перед анализом MS. Анализ пептидов имеет несколько преимуществ перед белками, включая более эффективное разделение жидкостной хроматографией (LC), более низкую молекулярную массу и меньшее количество зарядовых состояний, что приводит к улучшению чувствительности [41]. В зависимости от размера полученных пептидов подход может называться «снизу вверх», либо «с середины вниз». В стратегии «снизу вверх» белок гидролизуется в пептиды в пределах ~ 500–3000 Да. Эти пептиды затем анализируют с помощью жидкостной хроматографии с электрораспылительной ионизацией MS (LC-ESI-MS) или методом лазерной десорбционной ионизации с времяпролетным MS (MALDI-TOF-MS). Идентификация белка выполняется на основе анализа отпечатков пальцев в пептидной массе или пептидной последовательности [34]. Секвенирование пептидов может быть эффективно достигнуто путем диссоциации, вызванной столкновением (CID), в более широкодоступных масс-спектрометрах ESI-ион-ловушки и ESI-QTOF или с использованием MALDI-TOF / TOF приборов [30].

Переваривание сложного образца белка, например целого протеома с «снизу вверх» подходом, дает огромное количество пептидов, и даже больше, чем может анализировать даже самый эффективный инструмент. Сложность набора пептидов может быть уменьшена без ущерба для информационного содержимого за счет получения меньшего количества, но больших по размеру пептидов. Это, так называемый, средний уровень протеомного подхода, сочетает в себе лучшее из нисходящего и восходящего, используя преимущества усовершенствованной измерительной аппаратуры MS и доступность методов фрагментации на основе

электронов [42], сохраняя при этом уровень чувствительности, связанный с анализ пептидов [37]. Пептиды среднего уровня (~ 3000–20000 Да) показывают улучшенное разделение LC, и после ESI несут большее количество зарядов, что увеличивает фрагментацию CID [43], ETD [44] или ECD [45] в Orbitrap MS, квадрупольный линейной ион ловушки (QTrap) MS и квадрупольные приборы FTICR-MS. По сравнению с меньшими пептидами получают более уверенную идентификацию пептидов, что приводит к улучшению охвата последовательности белка и идентификации ПТМ [46].

Предсказуемая природа фрагментации пептидов позволяет сопоставлять экспериментальные спектры MS / MS с предсказанными спектрами при *in silico* известных белковых последовательностей для установления идентичности белка [47]. В этом отношении передовые средства биоинформатики играют ключевую роль в любых стратегиях протеомики. Однако эти средства основаны на предположении, что процесс переваривания (включая восстановление и алкилирование дисульфидных мостиков) является оптимальным. Если это не так, например, когда пептиды связаны через неповрежденный дисульфидный мостик, генерируются непредсказуемые пептиды и / или спектры сложной фрагментации, которые не будут идентифицироваться в автоматическом поиске базы данных. Переваривание белков может привести к потере информации, например, наличию и связности ПТМ [39] или способности отличать близкородственные белки из-за сбоя в обнаружении определенных частей белковой последовательности из-за неадекватного размера или неблагоприятных ионизационных свойств генерируемых пептидов. Наконец, качество полученных идентификаторов и модификаций белка можно контролировать с помощью ложных скоростей обнаружения, пороговых значений белка и пептида, но для этого требуется критический обзор полученных результатов.

Переваривание белка является важным шагом в стратегии протеомики «снизу вверх» и «с середины вниз» и оказывает значительное влияние на качество идентификации белка [48]. На протяжении многих лет переваривание белка улучшалось за счет разработки новых методов для увеличения пропускной способности и воспроизводимости [31].

Базы данных белков

На практике пептиды идентифицируют, как правило, используя системы поиска по базам данных белков, например Mascot [49], SEQUEST [50], X! Tandem [51], Inspect [52], OMSSA [53], MassMatrix [54], Crux [55], MyriMatch [56], MS-GFDB [57] и др.

Наиболее распространенными поисковыми системами являются первые три из перечисленного выше списка.

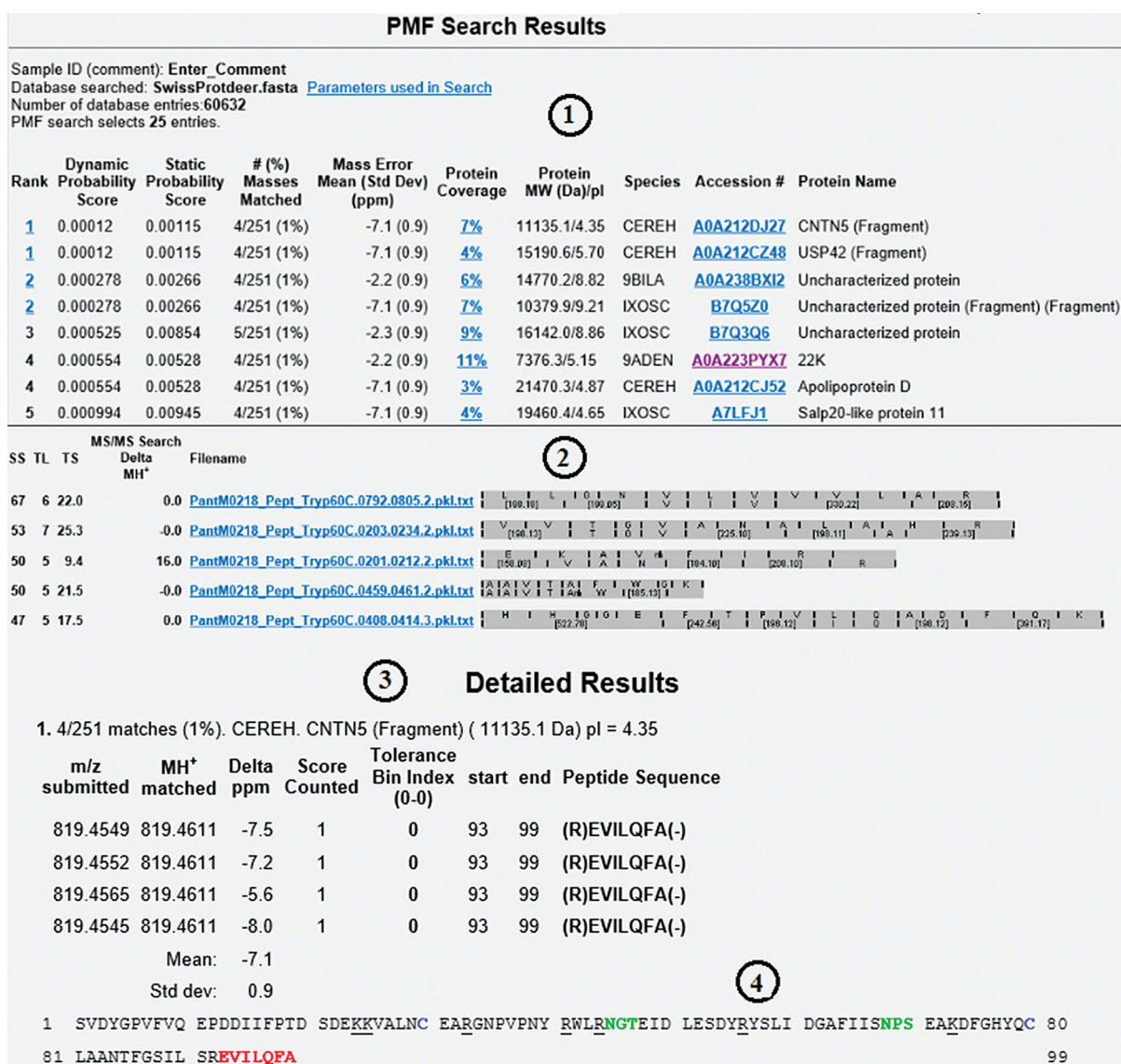


Рис. 3. Идентификация белка по международной базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (программа Mascot«MatrixScience», США) [59]. (1 — список потенциальных белков-кандидатов; 2 — расшифровка триптических пептидов с определением числа совпадений; 3 — распределение выявленных пептидов по аминокислотной последовательности; 4 — итоговый результат)

Поисковая система Mascot основана на алгоритме MOWSE (MOlecular Weight Search), предложенном в 1993 году Paprin с соавт. [58].

Данный алгоритм использует поиск по массовым «отпечаткам пальцев» пептидов. Вначале проводится сравнение масс пептидов из базы данных с экспериментальными данными масс пептидов с учетом заданной погрешности. Затем для каждого совпадения рассчитывается величина Score (так называемая величина уровня достоверности) в соответствии с формулой:

$$\text{Score} = \frac{5000}{M_{\text{prot}} \times \prod m_{i,j}}$$

где M_{prot} — молекулярная масса каждого совпавшего белка, $\prod$ — произведение, которое рассчитывается из Mowse-матрицы весов, $m_{i,j}$ — для каждого совпадения экспериментальных данных и масс пептидов, рассчитанных из записей в геномной базе данных.

Данный алгоритм можно применять для поиска МС/МС. В этом случае в формуле для Score роль белка выполняет пептид, а роль пептида — фрагмент. Сумма Score пептидов дает Score для белка. Также, для каждого из кандидатов, указаны видовая принадлежность, что может стать решающим при интерпретации, и ссылки на персональные страницы (итоговый результат), содержащие исчерпывающую информацию о потенциальном белке (значения его молекулярной массы и изоэлектрической точки, расшифровка последовательности триптических пептидов, число совпадений, % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами и т.д.) [60,61]. Данный алгоритм может быть применен для МС/МС-поиска.

Алгоритм оценки основан на вероятности, который имеет ряд преимуществ: (а) Простое правило может использоваться для оценки значимости результата или нет. Это особенно полезно для защиты

от ложных срабатываний. (b) Оценки можно сравнить с результатами других видов поиска, такими как гомология последовательности. (c) Параметры поиска могут быть легко оптимизированы путем итерации [62].

Поисковая система Sequest основана на отдельной идентификации каждого масс-спектра [50]. Ознакомиться с ресурсом можно на сайте [63,64]. В этом методе нуклеотидные базы данных транслируются в шести кадрах считывания, и полученные аминокислотные последовательности обыскиваются «на ходу» для идентификации и подгонки линейных последовательностей к шаблонам фрагментации, наблюдаемым в tandemных масс-спектрах пептидов. Затем используется функция взаимной корреляции для обеспечения измерения сходства между отношениями массы к заряду для ионов фрагментов, предсказанных аминокислотными последовательностями, переведенными из базы нуклеотидов, и ионами фрагментов, наблюдаемыми в tandemном спектре масс. В общем случае разница между 0,1 и 2 между нормированными функциями взаимной корреляции для результатов поиска первого и второго ранжирования указывает на успешное совпадение между последовательностью и спектром [45].

Поисковая система X! Tandem наиболее развита, так как является программным обеспечением с открытым исходным кодом. Ознакомиться с ресурсом можно на сайте [65].

TANDEM был написан для запуска из командной строки с именем входного XML-файла в качестве единственного параметра для командной строки. Код был создан с использованием набора классов, которые выполняют следующие задачи:

- (1) чтение файлов параметров ввода XML;
- (2) считывание последовательности белка из файлов FASTA;
- (3) чтение спектров MS / MS в общих форматах ASCII (DTA, PKL и Matrix Science);
- (4) состояние MS / MS спектров для удаления шума и общих артефактов;
- (5) обработка пептидных последовательностей с реагентами расщепления, посттрансляционными и химическими модификациями;
- (6) оценка последовательности пептидов;
- (7) создание файла вывода XML, в котором будут отображены лучшие скоринговые последовательности и некоторые статистические распределения, относящиеся к процессу подсчета очков [51].

Описанные алгоритмы не лишены недостатков. Например, Mascot присваивает высокие значения индекса коротким пептидам, которые не всегда являются уникальными для исследуемого белка, также при анализе протеолитических смесей пептидов в списке кандидатов присутствует множество последовательностей с близкими значениями Score, но программа окончательном рапорте оставляет только одну последовательность.

Недостатком алгоритма Sequest является высокая сложность вычислений и обобщений спектров. А X! Tandem, как вероятностный подход, в отдельных случаях не позволяет провести достоверную идентификацию. Краткое описание более 100 различных алгоритмов и пакетов программ обработки масс-спектрометрических данных по пептидам и белкам представлены на сайтах http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry_software и <http://www.ms-utils.org>. Использование баз данных для идентификации белков и пептидов позволяет расшифровывать масс-спектры сложных смесей за короткое время [66]. Почти все известные в настоящий момент аминокислотные последовательности белков и пептидов объединены в базы данных, которые находятся в открытом доступе в сети Интернет. Каждая из них имеет свой формат хранения данных, различную степень избыточности, взаимосвязи с родственными или аналогичными базами данных. Все базы данных можно разделить на пять типов. Первый тип — это архивные базы данных, в которых информация добавляется исследователями. К таким базам данных относятся GenBank, EMBL, PDB. Второй тип — это курируемые базы данных — содержание записей курируется специалистами, к ним относятся, например, Swiss-Prot. Третий тип — автоматические базы данных, в них записи генерируются компьютерными программами, к ним относятся, например, TrEMBL. Следующий тип — производные базы данных, которые пополняются за счет обработки данных из баз данных первых двух типов. Сюда входят SCOP, PFAM, GO и др. Пятый тип — интегрированные базы данных, которые объединяют информацию из различных баз. К такому типу относится ENTREZ [67]. Определение аминокислотной последовательности пептидов и белков без использования поисковых программ и баз данных называется de novo секвенированием. Такой подход применяется для идентификации не описанных ранее белков, при наличии неисследованных мутаций, пост- трансляционных модификаций и т.д. Применяемые алгоритмы de novo 36 секвенирования основаны на различных математических методах. Первые алгоритмы определения аминокислотной последовательности [68,69] представляли собой перебор всех возможных комбинаций аминокислот, составляющих массу родительского иона, фрагментацию которых сравнивали с экспериментальным масс-спектром. Очевидно, что погрешность измерения массы родительского иона влечет за собой увеличение количества соответствующих ему комбинаций.

Заключение

В настоящее время появляются новые лекарственные препараты белковой и пептидной природы, методы контроля конкретных белков в пищевой отрасли. Для определения сложных, многокомпонентных изменений, которые происходят в мясных продуктах, необ-

ходимо использовать методологические подходы, при которых возможно регистрировать сотни и тысячи белков. Одним из таких подходов является протеомика, которая позволяет идентифицировать и выявлять количественные и качественные изменения в белковом составе клеток и тканей. Достижения протеомики помогают исследователям решать задачи посттрансляционных модификаций, клеточной сигнализации, функциональной и структурной гомологии белков, определения уровня экспрессии генов. Наиболее значимым инструментом протеомики является изучение белковых карт тканей человека и животных.

Протеомные технологии представляются весьма перспективными и эффективными для выявления в мясных продуктах биохимических изменений, таких как изменения термостойчивых и видоспецифичных белков, способных стать соответствующими биомаркерами.

Introduction

Proteins are large biomolecules or macromolecules that consist of one or several long chains of amino acid residues. Proteins have a wide spectrum of functions inside organisms, including catalyzing metabolic reactions, DNA replication, a response to stimuli and transport of molecules from one place to another. Proteins are different from each other, primarily, by the amino acid sequence, which is determined by the nucleotide sequence of their genes. As a rule, this leads to protein folding into a specific three-dimensional structure, which determines its activity [1]. A linear chain of amino acid residues is called a polypeptide. A protein contains, at least, one long polypeptide. Short polypeptides that contain less than 20–30 residues are seldom recognized as proteins and usually called peptides or sometimes oligopeptides. The individual amino acid residues are linked together by the peptide bonds and adjacent amino acid residues. The sequence of amino acid residues in a protein is determined by a sequence of a gene that is encoded in the genetic code. In general, the genetic code specifies 20 standard amino acids; however, in some organisms the genetic code can include selenocysteine and in some organisms pyrrolysine. Shortly after or even during synthesis, post-translational modifications of the protein residues often occur, which change the physical and chemical properties, folding, stability, activity and, finally, the protein function [2]. Sometimes proteins contain non-peptide groups, which can be called prosthetic groups or co-factors. Proteins can also act together achieving a certain function and they are always associated with the development of stable protein complexes [3,4].

After formation, proteins exist only for a particular period of time, then they are degraded and processed by a cellular apparatus through a process of the protein cycle. The lifespan of proteins is measured by the period of their half-decay and comprises a wide range. They can exist for

В последние годы протеомика стала широко применяться в области биотехнологии. В работе, проделанной в ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, с помощью протеомных технологий были разработаны методические подходы по идентификации белкового профиля мясных продуктов и в исследуемых образцах мяса и в специально выработанных колбасных изделиях, были определены тканеспецифичные белки, которые могут быть использованы как индивидуальные биомаркеры при контроле мясных изделий на соответствие заявленному составу. Также были зарегистрированы соевый и куриный белки, что является маркером фальсификации [70,71].

Выражение признательности

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

several minutes or years with an average lifespan of 1–2 months in the mammalian cells. Abnormal or misfolded proteins degrade faster because of destruction or instability [5].

Like other biological macromolecules, such as polysaccharides and nucleic acids, proteins are crucial parts of organisms and participate almost in all processes in cells. Many proteins are enzymes that catalyze biochemical reactions and are essential for metabolism. Proteins also have the structural and mechanical functions: actin and myosin in muscles, proteins in the cytoskeleton, which form the system of microfilaments for maintenance of the cell shape. Other proteins play an important role in cell signaling, immune reactions, cell adhesion and the cell cycle. Proteins are necessary in animals' diets to provide the essential amino acids, which cannot be synthesized. Digestion disintegrates proteins to use in metabolism [6].

To perform their function, proteins interact with other substances on the molecular or ionic level, or with other proteins. Proteins interact in different contexts and with different results. Several proteins activate or deactivate other proteins by bonding with them or by their (de) phosphorylation. In the process of phosphorylation, the phosphate group is added (or removed) from a protein, which activates or deactivates a protein. Other proteins are linked with each other forming the so-called protein complexes. They play important roles in the whole cell, for example, in DNA replication. Other class of proteins is linked with each other to form structural complexes, which give a cell their three-dimensional structure. The understanding of these main interactions has a vital importance for the understanding of the internal processes of the vital activity of an organism.

Tissue-specific gene expression can lead to existence or absence of certain protein interactions and complexes resulting in deep functional differences of biological processes in tissues [7].

The understanding of the character of these interactions is important for studying how and why cells function. The interactions between all proteins in a cell comprise the so-called protein-protein interactions (PPIs) of a network. Not all proteins are present in all cells and tissue types; therefore, protein interactions are limited by cellular and tissue types, where both interacting proteins exist. These tissue-dependent interactions form tissue-specific PPIs (TSPPIs) [8].

To this end, the methodological aspects of analysis are studied and effective algorithms, which show the most significant results, are chosen or developed. In addition, the main properties of TSPPIs are studied to gain an insight about the structure of interactions and properties of particular protein groups. Finally, the algorithms of clusterization are used to reveal tissue-specific functional modules in the framework of TSPPIs [9].

It is particularly interesting to study the formation mechanisms of substances of protein and peptide nature that determine bio-corrective and quality characteristics of the pathways of their biosynthesis [10].

More and more attention is paid to bio-informatics as an instrument for studying proteome from the viewpoint of the hypothetical presence of certain biologically active peptides and marker proteins. According to the world databases, the muscle proteins of productive animals contain amino acid sequences that have various biological properties [11].

Main part

Approaches to studying proteins

The protein activity and structures can be studied in vitro, in vivo and in silico. In vitro investigations of purified proteins in the controlled environment are useful for studying how a protein executes its function: for example, studies of enzyme kinetics reveal the chemical mechanism of the catalytic activity of an enzyme and its relative affinity to different possible substrate molecules. On the contrary, in vivo experiments can give information about the physiological role of proteins in the context of a cell or even the whole organism. When using in silico investigations, the computational methods are used to study proteins.

In vivo investigations of proteins are often connected with protein synthesis and localization in a cell. The specifics of how proteins are targeted to specific organelles or cellular structures is often unclear, although it is known about many intracellular proteins synthesized in the cytoplasm and membrane-bound or secreted proteins in the endoplasmic reticulum [4]. A useful method for assessing cellular localization applies genetic engineering for expression in a cell of a fused protein or chimera that consists of the natural protein of interest linked with a «reporter», such as the green fluorescent protein (GFP) [12]. The fused protein location in a cell can be clearly and effectively visualized by microscopy [13].

There are experimental methods (for example, for detection, extraction and purification of proteins, as well as for deciphering the protein structure and functions, purification of the initial protein is often required). Computational methods usually use computer programs for protein analysis. However, many experimental methods (for example, mass-spectrometry) require computational analysis of raw data.

Genetic methods

Experimental analysis usually requires protein expression and purification. Expression is achieved by manipulating DNA, which encodes a protein of interest. Therefore, protein analysis usually requires the DNA methods especially cloning. Several proteins have never been directly sequenced; however, by translating codons from the known mRNA sequences into amino acids by the method known as «conceptual translation», the majority of protein molecules were analyzed. Site-directed mutagenesis differentially introduces mutations that change the protein structure. A function of protein parts can be better understood by analyzing changes in a phenotype as a result of this impact. Fusion proteins are obtained by inserting protein tags, such as His-tag to obtain a modified protein, which is easier to trace. An example of this can be Snf2H-GFP labeled complexes (chromatin-remodeling), which consist of protein linked with the green fluorescent label [14].

Analysis of DNA alleles can be identified as associated with diseases, for example, when calculating a LOD score developed by Newton Morton. It is a statistical test which is used for linkage analysis in human, animal and plant populations. The LOD score compares the likelihood of obtaining test data, if the two loci are really linked, with the likelihood of observing random events. Positive LOD scores favor the presence of linkage, while negative LOD scores indicate that linkage is less probable. Computerized analysis of a LOD score is a simple method for analysis of complex family pedigrees to detect a linkage between Mendelian traits (or between a trait and a marker, or two markers) [15].

There are also other possibilities. For example, immunohistochemistry usually uses an antibody to one or several proteins of interest, which are conjugated with enzymes giving either luminescent or chromogenic signals that can be compared between samples allowing obtaining information about localization. Another useful method is co-fractionation in gradients of sucrose (or other substance) with the use of isopycnic centrifugation [16].

Through another application in the field of genetic engineering, known as site-directed mutagenesis, the researchers can change the protein sequence and, therefore, its structure, cellular localization and susceptibility to regulation. This method even allows incorporation of non-natural amino acids into proteins using modified tRNA [17] and rational design of new proteins with new properties [18].

Proteomics

The main experimental methods of proteomics are two-dimensional electrophoresis [19], which makes it possible to separate a great quantity of proteins, mass-spectrometry, which allows rapid protein identification and high-throughput peptide sequencing (most often after digestion in a gel), protein microarrays, which enable detection of relative levels of many proteins that are present in a cell, and two-hybrid screening, which allows a systematic study of protein-protein interactions. The systematic endeavor to detect the protein structure is known as structural proteomics [20,21].

Bioinformatics

For analysis of the structure, functions and evolutions of proteins, a wide spectrum of computational methods was created.

The development of such instruments was conditioned by a large number of genomic and proteomic data available for different organisms including the human genome. It is impossible to study all proteins experimentally; thus, only several of them are subjected to laboratory experiments, and computational tools are used for extrapolation of similar proteins. These homologous proteins can be effectively identified in distant relatives by a sequence alignment. Genomic and gene sequences can be different tools for certain traits. Sequence profiling tools can find sites of restriction enzymes and predict secondary structures. Phylogenetic trees can be built, and evolution hypotheses are developed using the special software, such as ClustalW, regarding the origin of modern organisms and their expressed genes. The bioinformatics field is now irreplaceable for the gene and protein analysis.

Structure determination

Determination of the protein tertiary structure or the quaternary structure of its complexes can give important information about how a protein executes its function. Common experimental methods for structure determination include X-ray crystallography and NMR spectroscopy, which can generate information at atomic resolution. Nevertheless, NMR experiments can give information that allows assessing a subset of distances between atom pairs, and

the final possible protein conformations are determined by solving the distance geometry problem. Dual-polarization interferometry is a quantitative analytical method for measuring general conformation of proteins and conformational changes due to interactions or another stimulus. Circular dichroism is the other laboratory method for detection of the internal β -sheet/ α -helix protein composition. Electron cryomicroscopy is used for gaining structural information of lower resolution about very large protein complexes including assembled viruses, a variant known as electron crystallography can also give information with high resolution in some cases, especially, for two-dimensional crystals of membrane proteins. Determined protein structures are usually deposited in the ProteinData Bank (PDB), a freely accessible resource, from which structural data about thousands of proteins can be obtained as Cartesian coordinates for each atom in a protein.

Methods for prediction of a protein structure thrive to provide a way of creating credible structure for proteins, which structures are not determined experimentally [22,23].

Chromatographic methods

The most universal method for detection of peptide and protein purity is reversed-phase chromatography (RP-HPLC) based on the use of a broad spectrum of hydrophobic stationary phases [24]. To separate the components of the pharmaceutical preparations of peptide and protein nature, the reversed phases are most often employed with the use of the silica gel bonded to C8 and C18 alkyl groups with the average pore size of 300 Å. In RP-HPLC, elution of the pharmaceutical preparations of the peptide and protein nature or their fragments obtained as a result of the enzymatic degradation is usually performed in the mode of gradient elution at pH = 2 – 3 and a room temperature as partial or complete protein denaturation is possible when a temperature is increased, which also affects the chromatographic mobility [25,26].

The understanding of the mechanism of the polypeptide interaction with the reversed phase surface is important for the understanding of their separation in RP-HPLC. Separation of small molecules is connected with their continual partitioning between the mobile phase and the hy-

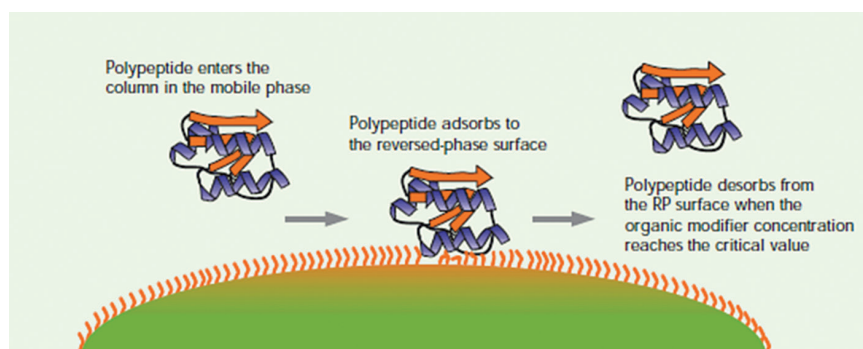


Figure 1. The «hydrophobic foot» of the polypeptide adsorbs to the hydrophobic surface of the reversed-phase material where it remains until the concentration of the organic modifier increases to the critical concentration [27]

drophobic stationary phase. However, polypeptides are too large for partition into the hydrophobic phase; they adsorb to the hydrophobic surface after they enter the column and remain adsorbed until the concentration of the organic modifier reaches the critical concentration necessary for desorption (Figure 1). Then, they desorb and, slightly interacting with the surface, elute down the column [27].

Polypeptides can be regarded as «sitting» on the stationary phase; with that, most of the molecule is exposed to the mobile phase and only a part of the molecule (the «hydrophobic foot») is in contact with the reversed-phase surface. RP-HPLC separates polypeptides based on the slight differences in the «hydrophobic foot» of the polypeptide being separated. The differences in the «hydrophobic foot» are conditioned by the differences in amino acid sequences as well as in conformation [27].

Mass spectrometry methods

At present, high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (MS) is one of the most common methods for protein and peptide analysis [28,29].

Recent advances illustrate the role of proteomics based on the mass spectrometry as an irreplaceable instrument for systems of molecular and cellular biology, as well as for new fields. They include analysis of the protein-protein interactions through affinity-based isolations on a small and widespread scale, mapping of multiple organelles, simultaneous description of the genome of the malaria parasite and generation of the quantitative protein profiles in different species. It can be expected that the ability of mass spectrometry to identify and increasingly often to quantify thousands of proteins in complex samples can profoundly affect biology and medicine.

Mass-spectrometric measurements are carried out in the gas phase on the charged ions. By definition, a mass spectrometer consists of a ion source, a mass-analyzer, which measures the mass-to-charge ratio (m/z) of the ionized analytes, and a detector, which records the number of ions at each m/z value.

At present, in proteomic investigations, four main types of mass analyzers are used. These are the ion-trap, time-of-flight (TOF), quadrupole and Fourier transform ion cyclotron (FT-MS) analyzers. They differ from each other in design and performance and each of them has its own strengths and weaknesses. These analyzers can be automatic or, in some cases, combined in tandem to take advantage of each of them [30].

To achieve mass separation, three different principles can be used: separation based on time of flight (TOF MS), separation by quadrupole electric fields generated by metal rods (quadrupole MS) or separation by selective ejection of ions from a three-dimensional trapping field (the ion trap or Fourier transform ion cyclotron resonance). For structural analysis, such as peptide sequencing, two stages of mass spectrometry are carried out in tandem (tandem mass spectrometry or MS / MS), which can be achieved

using the same principle of separation twice or by combination of two different principles of MS separation. Both MALDI and electrospray can be coupled to any of these three methods of separation. The fact that MALDI produces short bursts of ions in the vacuum, and electrospray creates a continuous beam of ions in atmosphere, as a rule, leads to coupling MALDI to TOF MS and electrospray to quadrupole and ion trap [29].

Identification of peptides and proteins

One of the main tasks of quality assessment of pharmaceutical preparations having the peptide and protein structure is protein identification. Proteins are identified, mostly, by their amino acid sequence. There are three approaches to mass spectrometric analysis of peptides and proteins.

The most common method is still «bottom-up» proteomics, when a protein is digested into peptides, which can be effectively analyzed using a broad spectrum of LC-MS or MALDI-TOF-MS instruments. Sample preparation for an experiment by the «bottom-up» method requires several laborious stages of transition of proteins to the peptide level. The most important step in these approaches is protein digestion, which is always a bottleneck as it requires a lot of time. Therefore, a significant increase in the throughput can be achieved by acceleration of the digestion process. Modern methods allow reducing digestion duration from overnight incubation (~ 15 hours) to minutes or even seconds. This achievement also makes possible integration into on-line systems, thereby, reducing the number of tiresome steps for sample processing and a risk of sample loss [31]. This section gives an overview of the available digestion strategies and recent changes in acceleration of the digestion process.

Protein digestion (both enzymatic and non-enzymatic) is an important and (almost) irreplaceable tool for identification, characterization and quantitative assessment of proteins using proteomics strategy [32].

Proteomics plays a crucial role in the main fields of investigations, including detection of disease biomarkers and biosystems and, as such, significantly contributes to the understanding of the vital biological processes [33].

The choice of proteomics approach should be based on a type of the question, which is to be answered. Global proteomics, for example, finding a biomarker in a very complex sample, deals with the identification of an often low-abundant unknown protein, which is present in a complex sample with a broad dynamic range of proteins. To this end, it is necessary to use a completely different approach than targeted protein analysis, such as, characterization of the post-translational modification (PTM) states, which requires a detailed study and complete mapping of a known protein sequence for localization of the possibly low-abundant post-translational modifications (PTMs). In addition, protein (classes) with certain characteristics may need special preparation.

Approaches in proteomics can be distinguished by the level of the analysis (Fig.2). Achievements in the field of mass spectrometry now allow direct protein analysis. In this «top-down» experiment purified proteins are detected intact and after fragmentation with the use of collisional-activated dissociation (CAD), electron capture dissociation (ECD) and electron transfer dissociation (ETD) giving information about the intact protein mass and amino acid sequence [34,35]. Analysis of the intact proteins by the «top-down» method minimizes sample preparation and saves information which can be lost in other proteomics strategies, such as connectivity of several PTMs, but it is comparatively insensitive [36]. Since analytes have large sizes, the requirements to the MS equipment in terms of resolution and mass accuracy are met only by high throughput mass spectrometers, such as Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FTICR-MS) and Orbitrap MS [37]. Nevertheless, intact protein analysis was also carried out using more available equipment such as tandem quadrupole and quadrupole time-of-flight mass spectrometer (QTOF MS). In practice, the protein mass range that can be analyzed using «top-down» proteomics is limited to ~ 50 kDa, therefore, about 500 amino acids [38]. Otherwise, only the C-terminal and N-terminal ends are sequenced [39,40]. Despite the obvious advantages of «top-down» proteomics, the further development of MS equipment is necessary before it will become the main technology.

The overwhelming majority of proteomic experiments envisage a procedure of protein digestion into peptides before MS analysis. Analysis of peptides has several advantages compared to proteins, including more effective separation by liquid chromatography (LC), lower molecular mass and lower number of charge states resulting in an increase in sensitivity [41]. Depending on the size of the obtained peptides, an approach can be called «bottom-up» or «middle-down». In the «bottom-up» strategy a protein is hydrolyzed to peptides in a range of ~ 500–3000 Da. Then, these peptides are analyzed by liquid

chromatography coupled to electrospray ionization MS (LC-ESI-MS) or matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS). Protein identification is carried out based on peptide mass fingerprints or peptide sequences [34]. Peptide sequencing can be successfully performed by collision-induced dissociation (CID) in more available ESI-ion trap and ESI-QTOF mass-spectrometry or MALDI-TOF/TOF equipment [30].

Digestion of the complex protein sample, for example, the whole proteome using the «bottom-up» approach gives a large number of peptides and even more that can be analyzed by the most powerful instrument. The complexity of the peptide set can be reduced without loss of the information content due to production of lower quantity of larger peptides. This is the so-called «middle-down» proteomic approach, which combines the best of the «top-down» and «bottom-down» approaches using the advantages of the improved MS measuring equipment and availability of the fragmentation methods based on electrons [42], maintaining the same sensitivity level associated with the peptide analysis [37]. Peptides of the middle range (~ 3000–20000 Da) show improved separation by LC and after ESI carry a higher number of charges, which enhances fragmentation by CID [43], ETD [44] or ECD [45] in Orbitrap MS, quadrupole-linear ion trap (QTrap) MS and quadrupole-FTICR MS instruments. Compared to smaller peptides, more reliable peptide identification is obtained resulting in an improvement of protein sequence coverage and PTM identification [46].

The predictable nature of peptide fragmentation allows comparing the experimental MS / MS spectra with predicted spectra in *in silico* of known protein sequences for protein identification [47]. In this regard, the advanced tools of bioinformatics play a key role in all proteomics strategies. However, these tools are based on an assumption that the digestion process (including reduction and alkylation of disulfide bridges) is optimal. If it is not true, for example, when peptides are bond through the intact

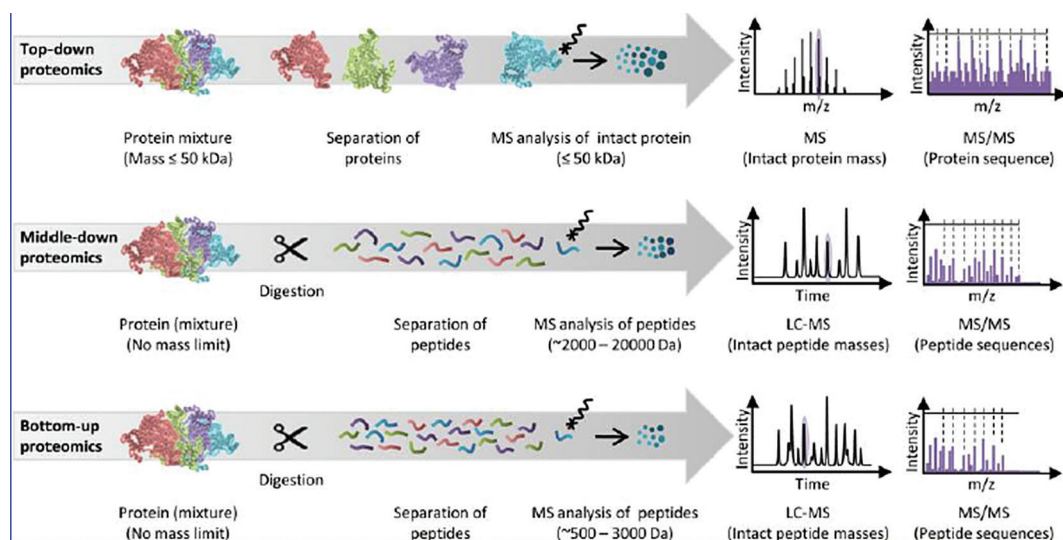


Figure 2. Overview of proteomics approaches [31]

disulfide bridge, the unpredictable peptides and/or complex fragmentation spectra are generated, which will not be identified in an automated database search. Protein digestion can lead to loss of information, for example, the PTM presence and connectivity [39] or an ability to distinguish closely related proteins due to a failure in detection of certain parts of a protein sequence because of the inadequate size or unfavorable ionization properties of the generated peptides. Finally, the quality of the obtained protein identifications and modifications can be controlled by false detection rates, protein and peptide score threshold; however, a critical review of the obtained results is necessary.

Protein digestion is an important step in the «bottom-up» and «middle-down» proteomics strategy and significantly affects protein identification quality [48]. For many years, protein digestion has been improved due to the development of new methods for increasing throughput and reproducibility [31].

Protein databases

In practice, peptides, as a rule, are identified by searching protein databases using the search systems, for example, Mascot [49], SEQUEST [50], X! Tandem [51], Inspect [52], OMSSA [53], MassMatrix [54], Crux [55], MyriMatch [56], MS-GFDB [57] and others.

The most common search systems are the first three of the above-mentioned list.

The search system Mascot is based on the MOWSE algorithm (MOlecular Weight Search), proposed by Pappin et al. in 1993 [58].

This algorithm uses the search by mass fingerprints of peptides. At first, the peptide masses from a database are compared with the experimental data on peptide masses with consideration for the specified error. Then, for each match, the Score value (the so-called confidence level) is calculated according to the equation:

$$\text{Score} = \frac{5000}{M_{\text{prot}} \times \prod_{i,j} m_{i,j}}$$

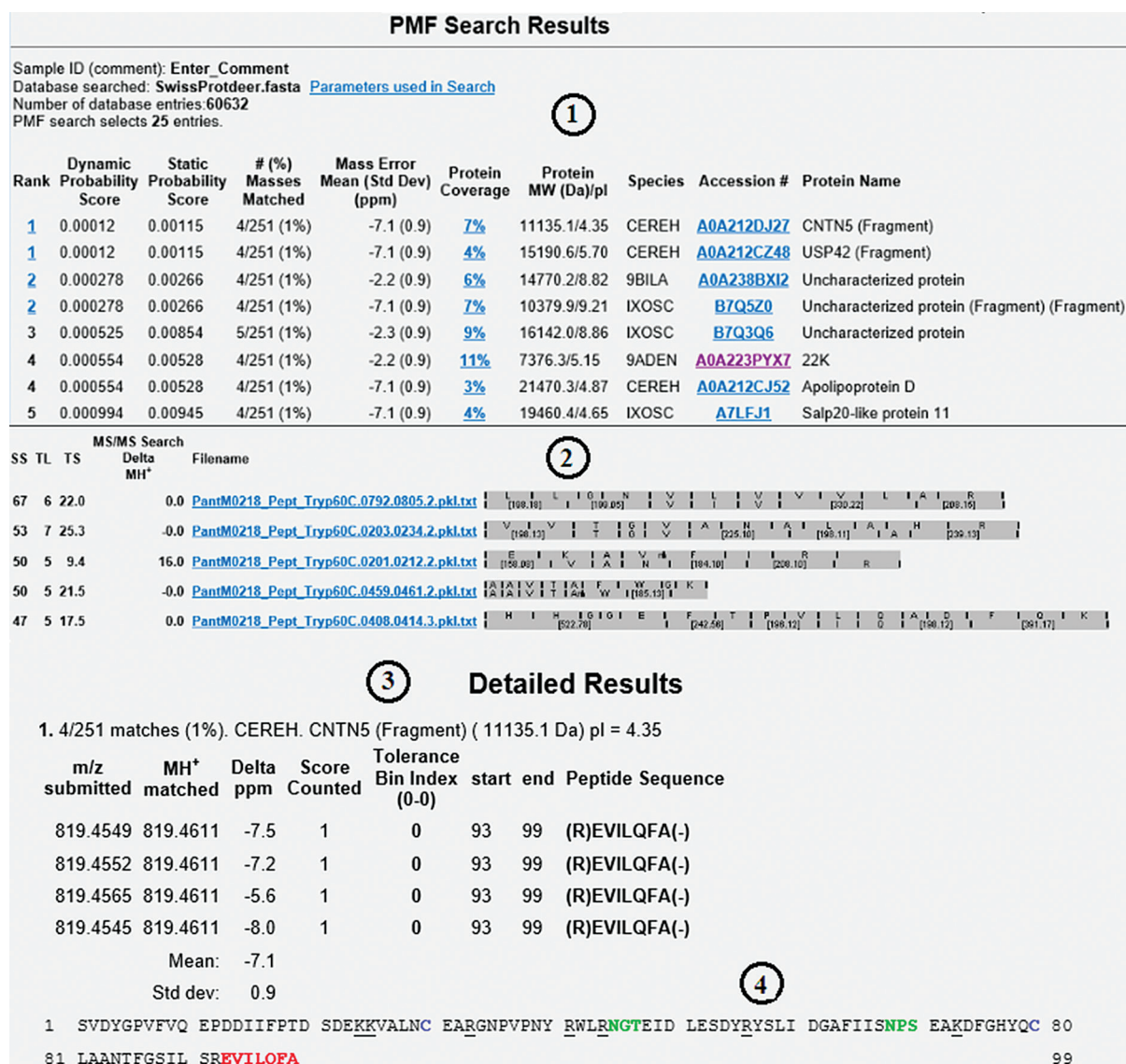


Figure 3. Protein identification by the international database of the the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA) (software Mascot «MatrixScience», (USA) [59]. (1 — list of potential candidate proteins; 2 — decryption of tryptic peptides with a certain number of matches; 3 — distribution of the revealed peptides along the amino acid sequence; 4 — final result)

where M_{prot} — molecular mass of each matching protein,

Π_n — is a product, which is calculated from the Mowse-weight matrix, $m_{i,j}$ — for each matching between the experimental data and peptide masses calculated from the entries in the genomic database.

This algorithm can be used for an MS/MS search. In this case, in the equation for Score, a peptide plays a role of a protein, and a fragment plays a role of a peptide. The sum of the peptide scores gives the Protein Score. Also, for each candidate, the species origin is given, which can become decisive for interpretation, and references to the personal pages (final result) that contain the comprehensive information about a potential protein (values of its molecular mass and isoelectric point, decryption of a tryptic peptide, a number of matches, % of coverage of the complete amino acid sequence of a protein by peptides and so on) [60,61]. This algorithm can be used for an MS/MS search.

The assessment algorithm is based on probability, which has several advantages: (a) a simple rule can be used for assessment whether a result is significant or not. This is especially useful for protection from false responses. (b) Scores can be compared with the results of other types of search, such as sequence homology. (c) Search parameters can be easily optimized by iteration [62].

The Sequest search system is based on the individual identification of each mass spectrum [50]. This resource can be found on the site [63,64]. In this method, the nucleotide databases are translated in six reading frames and obtained amino acid sequences are searched during the process to identify and fit the linear sequences to the fragmentation templates found in the tandem mass-spectra of peptides. Then the mutual correlation function is used for measuring the similarity between the mass-to-charge ratio for the ions of fragments predicted by the amino acid sequences translated from the nucleotide database and the ions of fragments observed in the tandem mass spectrum. Generally, the difference of 0.1 to 2 between normed mutual correlation functions for the results of the search for the first and second ranking indicates a successful matching between a sequence and a spectrum [45].

The X! Tandem searching system is the most developed, as it is a software with an open source code. The information about the resource can be found on the site [65].

TANDEM was created for running from the command line with the name of the input XML file as a single parameter for the command line. The code was developed with the use of a set of classes that can accomplish the following tasks:

- (1) reading XML input parameter files;
- (2) reading protein sequences from FASTA files;
- (3) reading MS / MS spectra in common ASCII formats (DTA, PKL and Matrix Science);
- (4) conditioning MS / MS spectra to remove noise and common artifacts;
- (5) processing peptide sequences with the cleavage reagents, post-translational and chemical modifications;

(6) scoring peptide sequences;

(7) creating an XML output file that will reflect the best scoring sequences and several statistical distributions relevant to the scoring process [51].

The described algorithms are not without drawbacks. For example, Mascot assigns high values of the index to short peptides, which are not always unique for the studied protein; also, in analysis of the proteolytic peptide mixtures many sequences with close score values are present in the list of candidates; however, the program in the final report leaves only one sequence.

A disadvantage of the Sequest algorithm is the high complexity of calculations and generalizations of spectra. X! Tandem, as a probabilistic approach, in certain cases does not allow performing reliable identification. A brief description of more than 100 different algorithms and software packages for processing of mass spectrometry data on peptides and proteins are presented on the sites http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry_software и <http://www.ms-utils.org>.

The use of the databases for protein and peptide identification allows deciphering mass-spectra of complex mixtures over a short period of time [66]. Almost all known amino acid sequences of proteins and peptides are combined in web open-access databases. Each of them has its own format for data storage, various degree of redundancy, interaction with related or similar databases. All databases can be divided into five types. The first type is archive databases, where information is entered by users. These databases include GenBank, EMBL, PDB. The second type is curated databases, which content is curated by specialists, such as Swiss-Prot. The third type is automated databases, where entries are generated by computer programs; they include, for example, TrEMBL. The next type is derivative databases which are supplemented by processing data from databases of the first two types. They include SCOP, PFAM, GO and others. The fifth type is integrated databases, which combines information from different databases, such as ENTREZ [67]. Detection of an amino acid sequence of peptides and proteins without using search programs and databases is called de novo sequencing. This approach is used for identification of proteins that were not described earlier, in case of the presence of unstudied mutations, post-translational modifications and so on. The used algorithms for de novo 36 sequencing are based on different mathematical methods. The first algorithms for determination of amino acid sequence [68,69] represented a search of all possible combinations of amino acids comprising the mass of the parent ion, which fragmentation was compared to the experimental mass spectrum. It is obvious that an error in measuring the mass of the parent ion leads to an increase in the number of corresponding combinations.

Conclusion

At present, new pharmaceutical preparations of protein and peptide nature, the methods for control of specific proteins emerge in food sector. To detect complex, multi-com-

ponent changes occurring in meat products, it is necessary to use methodological approaches, which allow registering hundreds and thousands of proteins. One of these approaches is proteomics, which makes it possible to identify and reveal quantitative and qualitative changes in the protein composition of cells and tissues. The advances of proteomics help researchers to solve tasks of post-translational modifications, cell signaling, functional and structural homology of proteins, detection of a gene expression level. The most significant instrument of proteomics is investigation of the protein maps of human and animal tissues.

Proteomic technologies are considered quite promising and effective for detection of the biochemical changes in meat products, for example, the changes in the thermally stable and species specific proteins, which are capable of becoming corresponding biomarkers.

Recently, proteomics became widely used in the field of biotechnology. Using the proteomic technologies, the Gorbatov Research Center for Food Systems has developed the methodological approaches for identification of the protein profile of meat products, experimental meat samples and specially produced sausage products, determined tissue-specific proteins, which can be used as individual biomarkers upon controlling meat products for correspondence to the stated composition. Also, soya and chicken proteins were registered, which are the marker of falsification [70,71].

Acknowledgments

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

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК:

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts K., Walter P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 318.
2. Kent, S.B. (2009). Total chemical synthesis of proteins. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 338–351.
3. Pickel, B., Schaller, A. (2013). Dirigent proteins: molecular characteristics and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(19), 8427–8438.
4. Protein. (2018). [Электронный ресурс: <https://en.wikipedia.org/wiki/Protein> Дата обращения 01.05.2018]
5. Wickner, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding and degrading proteins. *Science*, 286, 1888–1893.
6. Марри, Р., Греннер, Д., Мейес, П., Родуэлл, В. (1993). Биохимия человека: В 2-х томах. Т. 2. (Перевод с английского канд. физ.-мат. наук В. В. Борисова и канд. физ.-мат. наук Е. В. Дайниченко, под редакцией д-ра хим. наук А. М. Гиномдана). М., Мир. — 415 с. ISBN: 5-03-001774-7
7. Emig, D., Albrecht, M. (2011). Tissue-specific proteins and functional implications. *Journal of Proteome Research*, 10(4), 1893–1903.
8. Chen, G., Wang, J. (2012). Identifying functional modules in tissue specific protein interaction network. *Proceedings — 2012 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops*, BIBMW 6470204, 581–586.
9. Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., Gerstein, M. (2013). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*, 4(9), 117.
10. Picard, B., Lebret, B., Cassar-Malek, I., Liaubet, L., Berri, C., Nihan-Duval, B., Hocquette, J.F., Renand, G. (2015). Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Science*, 109, 18–26
11. Вострикова, Н.А., Чернуха, И.М. (2017). Биоинформатика — инструмент интерпретации протеомных профилей белков мяса. *Теория и практика переработки мяса*, 2(1), 4–17.
12. Stepanenko, O.V., Verkhusha, V.V., Kuznetsova, I.M., Uversky, V.N., Turoverov, K.K. (2008). Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Current Protein and Peptide Science*, 9(4), 338–369.
13. Yuste, R. (2005). Fluorescence microscopy today. *Nature Methods*, 2(12), 902–904.
14. Collins, N., Poot, R.A., Kukimoto, I., Garcia-Jimenez, C., Del-laure, G., Varga-Weisz, P.D. (2002). An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nature Genetics*, 32, 627–632.
15. Morton N.E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics*, 7 (3), 277–318.
16. Walker, J.H., Wilson, K. (2000). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 287–289.
17. Hohsaka, T., Sisido, M. (2002). Incorporation of non-natural amino acids into proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(6), 809–815.
18. Cedrone, F., Ménez, A., Quéméneur, E. (2000). Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(4), 405–410.
19. Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665–3685.
20. Koegl, M., Uetz, P. (2007). Improving yeast two-hybrid screening systems. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 6(4), 302–312.
21. Conrotto, P., Souchelnytskyi, S. (2008). Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications. *Experimental Oncology*, 30(3), 171–180.
22. Zhang, C., Kim, S.H. (2003). Overview of structural genomics: from structure to function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(1), 28–32.
23. Standley, D.M., Kinjo, A.R., Kinoshita, K., Nakamura, H. (2008). Protein structure databases with new web services for structural biology and biomedical research. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 276–285.
24. Harvey, D. (2000). *Modern analytical chemistry. USA: The McGraw-Hill Companies.* — 816 p.
25. Kroeff, E., Owens, R., Campbell, E., Johnson, R., Marks, H. (1989). Production scale purification of biosynthetic human insulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 461, 45–61.
26. Seino, S., Funakoshi, A., Fu, Z., Vinik, A. (1985). Identification of insulin variants in patients with hyperinsulinemia by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Diabetes*, 34(1), 1–7.
27. Grace, V. (2002). Technical Support Group. *The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC*. Third Edition, 4–5.
28. Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207.
29. Mann, M., Hendrickson, R., Pandey, A. (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 437–473.
30. Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207.
31. Switzer, L., Giera, M., Niessen, W. (2013). Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of Proteome Research*, 12(3), 1067–1077.
32. Angel, T. E., Aryal, U. K., Hengel, S. M., Baker, E. S., Kelly, R. T., Robinson, E. W., Smith, R. D. (2012). Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chemical Society Reviews*, 41(10), 3912–3928.
33. Marko-Varga, G., Fehniger, T. E. (2004). Proteomics and disease—the challenges for technology and discovery. *Journal of Proteome Research*, 3(2), 167–178.
34. Calligaris, D., Villard, C., Lafitte, D. (2011). Advances in top-down proteomics for disease biomarker discovery. *Journal of Proteomics*, 74(7), 920–934.
35. Chait, B. T. Chemistry. (2006). Mass spectrometry: bottom-up or topdown. *Science*, 314(5796), 65–66.
36. Wu, S. — L., Hühner, A. F. R., Hao, Z., Karger, B. L. (2007). On-line LC–MS approach combining collision-induced dissociation (CID), electron-transfer dissociation (ETD), and CID of an iso-

lated charge-reduced species for the trace-level characterization of proteins with post-translational modifications. *Journal of Proteome Research*, 6(11), 4230–4244.

37. McLafferty, F. W., Breuker, K., Jin, M., Han, X., Infusini, G., Jiang, H., Kong, X., Begley, T. P. (2007). Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS Journal*, 274(24), 6256–6268.

38. Lanucara, F.; Eysers, C. E. (2013). Top-down mass spectrometry for the analysis of combinatorial post-translational modifications. *Mass Spectrometry Reviews*, 32(1), 27–42.

39. Han, X., Jin, M., Breuker, K., McLafferty, F. W. (2006). Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses great than 200 kilodaltons. *Science*, 314(5796), 109–112.

40. Chi, A., Bai, D. L., Geer, L. Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. (2007). Analysis of intact proteins on a chromatographic time scale by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 259(1–3), 197–203.

41. Compton, P. D., Zamborg, L., Thomas, P. M., Kelleher, N. L. (2011). On the scalability and requirements of whole protein mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83(17), 6868–6874.

42. Boyne, M. T., Garcia, B. A., Li, M., Zamborg, L., Wenger, C. D., Babai, S., Kelleher, N. L. (2008). Tandem mass spectrometry with ultrahigh mass accuracy clarifies peptide identification by database retrieval. *Journal of Proteome Research*, 8(1), 374–379.

43. Cannon, J., Lohnes, K., Wynne, C., Wang, Y., Edwards, N., Fenselau, C. (2010). High-throughput middle-down analysis using an orbitrap. *Journal of Proteome Research*, 9(8), 3886–3890.

44. Hauser, N. J., Han, H., McLuckey, S. A., Basile, F. (2008). Electron transfer dissociation of peptides generated by microwave D-cleavage digestion of proteins. *Journal of Proteome Research*, 7(5), 1867–1872.

45. Kalli, A., Hakansson, K. (2010). Electron capture dissociation of highly charged proteolytic peptides from Lys N, Lys C and Glu C digestion. *Molecular Biosystems*, 6(9), 1668–1681.

46. Wu, S. — L., Kim, J., Hancock, W. S., Karger, B. (2005). Extended Range Proteomic Analysis (ERPA): A new and sensitive LC–MS platform for high sequence coverage of complex proteins with extensive post-translational modifications-comprehensive analysis of beta-casein and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *Journal of Proteome Research*, 4(4), 1155–1170.

47. Deutsch, E. W., Lam, H., Aebersold, R. (2008). Data analysis and bioinformatics tools for tandem mass spectrometry in proteomics. *Physiological Genomics*, 33(1), 18–25.

48. Brownridge, P., Beynon, R. J. (2011). The importance of the digest: proteolysis and absolute quantification in proteomics. *Methods*, 54(4), 351–360.

49. Perkins, D., Pappin, D., Creasy, D., Cottrell, J. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18), 3551–3567.

50. Eng, J., McCormack, A., Yates, J. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 5(11), 976–989.

51. Craig, R., Beavis, R. (2004). TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics*, 20(9), 1466–1467.

52. Tanner, S., Shu, H., Frank, A., Wang, L., Zandi, E., Mumby, M., Pevzner, P., Bafna, V. (2005). InsPecT: identification of posttranslationally modified peptides from tandem mass spectra. *Analytical Chemistry*, 77(14), 4626–4639.

53. Geer, L., Markey, S., Kowalak, J., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D., Yang, X., Shi, W., Bryant, S. (2004). Open mass spectrometry search algorithm. *Journal of Proteome Research*, 3(5), 958–964.

54. Xu, H., Freitas, M. (2009). MassMatrix: a database search program for rapid characterization of proteins and peptides from tandem mass spectrometry data. *Proteomics*, 9(6), 1548–1555.

55. Park, C., Klammer, A., Kall, L., MacCoss, M., Noble, W. (2008). Rapid and accurate peptide identification from tandem mass spectra. *Journal of Proteome Research*, 7(7), 624–627.

56. Tabb, D., Fernando, C., Chambers, M. (2007). MyriMatch: highly accurate tandem mass spectral peptide identification by multivariate hypergeometric analysis. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 654–661.

57. Kim, S., Mischerikow, N., Bandeira, N., Navarro, J., Wich, L., Mohammed, S., Heck, A., Pevzner, P. (2010). The generating function of CID, ETD, and CID/ETD pairs of tandem mass spectra: applications to database search. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(12), 2840–2852.

58. Pappin, D., Hojrup, P., Bleasby, A. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology*, 3(6), 327–332.

59. Mascot software, the benchmark for identification, characterisation and quantitation of proteins using mass spectrometry data. [Электронный ресурс: <http://www.matrixscience.com>. Дата обращения 07.07.2018]

60. Perkins, D., Pappin, D., Creasy, D., Cottrell, J. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18), 3551–3567.

61. Автономов, Д., Агрон, И., Кононихин, А., Николаев, Е. (2009). Создание базы данных точных массово-временных меток для качественного и количественного подхода в исследовании протеома мочи человека с использованием изотопного мечения. *Труды МФТИ*, 1(1), 24–29 с.

62. Scoring Schemes. [Электронный ресурс: https://edwardslab.bmcb.georgetown.edu/mascot/help/scoring_help.html. Дата обращения 08.06.2018]

63. Protein Digestion. [Электронный ресурс: <http://proteomicsresource.washington.edu/protocols06/sequest.php>. Дата обращения 13.07.2018]

64. SEQUEST correlates uninterpreted tandem mass spectra of peptides with amino acid sequences from protein and nucleotide databases. [Электронный ресурс: <http://fields.scripps.edu/sequest/index.html>. Дата обращения 03.04.2018]

65. X! Tandem open source is software that can match tandem mass spectra with peptide sequences, in a process that has come to be known as protein identification. [Электронный ресурс: <http://www.thegpm.org/tandem>. Дата обращения 11.04.2018]

66. Sparkman, D. (2012). Informatics and mass-spectral databases in the evaluation of environmental mass spectral data. Saint Albans: ILMPublications.—528 p.

67. Объединенный центр вычислительной биологии и информатики. [Электронный ресурс: <http://www.jcbi.ru/index.html>. Дата обращения 10.05.2018]

68. Hamm, C., Wilson, W., Harvan, D. (1986). Peptide sequencing program. *Computer Applications in the Biosciences*, 2(2), 115–118.

69. Беризовская, Е.И., Ихалайнен, А.А., Антохин, А.М., Таранченко, В.Ф., Гончаров, В.М., Митрофанов Д.А., Аксенов, А.В., Родин, И.А., Шпигун, О.А. (2014). Возможности масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением в определении моноизоотопных молекулярных масс рекомбинантного инсулина человека и его аналогов. *Масс-спектрометрия*, 11(4), 231–238.

70. Vostrikova, N.L., Chernukha, I.M., Kulikovskiy, A.V., Shishkin, S.S. (2016). 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. *Foods and Raw Materials*, 4(2), 136–147.

71. 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.

REFERENCES

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts K., Walter P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 318.
2. Kent, S.B. (2009). Total chemical synthesis of proteins. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 338–51.
3. Pickel, B., Schaller, A. (2013). Dirigent proteins: molecular characteristics and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(19), 8427–8438.
4. Protein (2018). [Electronic resource: <https://en.wikipedia.org/wiki/Protein> Date of circulation 01.05.2018]
5. Wickner, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding and degrading proteins. *Science*, 286, 1888–1893.

6. Marri, R., Grenner, D., Meyyes, P., Roduell, W. (1993). *Human Biochemistry: In 2 volumes. T. 2.* (Translated from English by V.V. Borisova and Candidate of Physical and Mathematical Sciences E.V. Dainichenko, edited by L.M. Ginodman, Doctor of Chemical Sciences). M: World. — 415 p. ISBN: 5–03–001774–7. (In Russian)
7. Emig, D., Albrecht, M. (2011). Tissue-specific proteins and functional implications. *Journal of Proteome Research*, 10(4), 1893–1903.
8. Chen, G., Wang, J. (2012). Identifying functional modules in tissue specific protein interaction network. *Proceedings IEEE In-*

ternational Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops, BIBMW 6470204, 581–586.

9. Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., Gerstein, M. (2013). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*, 4(9), 117.
10. Picard, B., Lebret, B., Cassar-Malek, I., Liaubet, L., Berri, C., Nihan-Duval, B., Hocquette, J.F., Renand, G. (2015). Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Science*, 109, 18–26.
11. Vostrikova, N.L., Chernukha, I.M. (2017). Bioinformatics – instrument interpretation proteomic profiles of meat protein. *Theory and practice of meat processing*, 2(1), 4–17.
12. Stepanenko, O.V., Verkhusha, V.V., Kuznetsova, I.M., Uversky, V.N., Turoverov, K.K. (2008). Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Current Protein and Peptide Science*, 9(4), 338–69.
13. Yuste, R. (2005). Fluorescence microscopy today. *Nature Methods*, 2(12), 902–904.
14. Collins, N., Poot, R.A., Kukimoto, I., Garcia-Jimenez, C., Delaire, G., Varga-Weisz, P.D. (2002). An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nature Genetics*, 32, 627–632.
15. Khwannimit, B. (2008). Serial evaluation of the MODS, SOFA and LOD scores to predict ICU mortality in mixed critically ill patients. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 91(9), 1336–1342.
16. Walker, J.H., Wilson, K. (2000). Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Cambridge University Press, 287–289.
17. Hoshaka, T., Sisido, M. (2002). Incorporation of non-natural amino acids into proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(6), 809–815.
18. Cedrone, F., Ménez, A., Quéméneur, E. (2000). Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(4), 405–410.
19. Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665–3685.
20. Koegl, M., Uetz, P. (2007). Improving yeast two-hybrid screening systems. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 6(4), 302–312.
21. Conrotto, P., Souchelnytskyi, S. (2008). Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications. *Experimental Oncology*, 30(3), 171–180.
22. Zhang, C., Kim, S.H. (2003). Overview of structural genomics: from structure to function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(1), 28–32.
23. Standley, D.M., Kinjo, A.R., Kinoshita, K., Nakamura, H. (2008). Protein structure databases with new web services for structural biology and biomedical research. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 276–285.
24. Harvey, D. (2000). Modern analytical chemistry. USA: The McGraw-Hill Companies. – 816 p.
25. Kroeff, E., Owens, R., Campbell, E., Johnson, R., Marks, H. (1989). Production scale purification of biosynthetic human insulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 461, 45–61.
26. Seino, S., Funakoshi, A., Fu, Z., Vinik, A. (1985). Identification of insulin variants in patients with hyperinsulinemia by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Diabetes*, 34(1), 1–7.
27. Grace, V. (2002). Technical Support Group. The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC. Third Edition, 4–5.
28. Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207.
29. Mann, M., Hendrickson, R., Pandey, A. (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 437–473.
30. Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207.
31. Switzer, L., Giera, M., Niessen, W. (2013). Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of Proteome Research*, 12(3), 1067–1077.
32. Angel, T. E., Aryal, U. K., Hengel, S. M., Baker, E. S., Kelly, R. T., Robinson, E. W., Smith, R. D. (2012). Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chemical Society Reviews*, 41(10), 3912–3928.
33. Marko-Varga, G., Fehniger, T. E. (2004). Proteomics and disease—the challenges for technology and discovery. *Journal of Proteome Research*, 3(2), 167–178.
34. Calligaris, D., Villard, C., Lafitte, D. (2011). Advances in top-down proteomics for disease biomarker discovery. *Journal of Proteomics*, 74(7), 920–934.

35. Chait, B. T. Chemistry. (2006). Mass spectrometry: bottom-up or topdown. *Science*, 314(5796), 65–66.
36. Wu, S. — L., Hühner, A. F. R., Hao, Z., Karger, B. L. (2007). On-line LC–MS approach combining collision-induced dissociation (CID), electron-transfer dissociation (ETD), and CID of an isolated charge-reduced species for the trace-level characterization of proteins with post-translational modifications. *Journal of Proteome Research*, 6(11), 4230–4244.
37. McLafferty, F. W., Breuker, K., Jin, M., Han, X., Infusini, G., Jiang, H., Kong, X., Begley, T. P. (2007). Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS Journal*, 274(24), 6256–6268.
38. Lanucara, F.; Eysers, C. E. (2013). Top-down mass spectrometry for the analysis of combinatorial post-translational modifications. *Mass Spectrometry Reviews*, 32(1), 27–42.
39. Han, X., Jin, M., Breuker, K., McLafferty, F. W. (2006). Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses great than 200 kilodaltons. *Science*, 314(5796), 109–112.
40. Chi, A., Bai, D. L., Geer, L. Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. (2007). Analysis of intact proteins on a chromatographic time scale by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 259(1–3), 197–203.
41. Compton, P. D., Zamborg, L., Thomas, P. M., Kelleher, N. L. (2011). On the scalability and requirements of whole protein mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83(17), 6868–6874.
42. Boyne, M. T., Garcia, B. A., Li, M., Zamborg, L., Wenger, C. D., Babai, S., Kelleher, N. L. (2008). Tandem mass spectrometry with ultrahigh mass accuracy clarifies peptide identification by database retrieval. *Journal of Proteome Research*, 8(1), 374–379.
43. Cannon, J., Lohnes, K., Wynne, C., Wang, Y., Edwards, N., Fenselau, C. (2010). High-throughput middle-down analysis using an orbitrap. *Journal of Proteome Research*, 9(8), 3886–3890.
44. Hauser, N. J., Han, H., McLuckey, S. A., Basile, F. (2008). Electron transfer dissociation of peptides generated by microwave D-cleavage digestion of proteins. *Journal of Proteome Research*, 7(5), 1867–1872.
45. Kalli, A., Hakansson, K. (2010). Electron capture dissociation of highly charged proteolytic peptides from Lys N, Lys C and Glu C digestion. *Molecular Biosystems*, 6(9), 1668–1681.
46. Wu, S. — L., Kim, J., Hancock, W. S., Karger, B. (2005). Extended Range Proteomic Analysis (ERPA): A new and sensitive LC–MS platform for high sequence coverage of complex proteins with extensive post-translational modifications-comprehensive analysis of beta-casein and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *Journal of Proteome Research*, 4(4), 1155–1170.
47. Deutsch, E. W., Lam, H., Aebersold, R. (2008). Data analysis and bioinformatics tools for tandem mass spectrometry in proteomics. *Physiological Genomics*, 33(1), 18–25.
48. Brownridge, P., Beynon, R. J. (2011). The importance of the digest: proteolysis and absolute quantification in proteomics. *Methods*, 54(4), 351–360.
49. Perkins, D., Pappin, D., Creasy, D., Cottrell, J. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18), 3551–3567.
50. Eng, J., McCormack, A., Yates, J. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 5(11), 976–989.
51. Craig, R., Beavis, R. (2004). TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics*, 20(9), 1466–1467.
52. Tanner, S., Shu, H., Frank, A., Wang, L., Zandi, E., Mumby, M., Pevzner, P., Bafna, V. (2005). InsPecT: identification of posttranslationally modified peptides from tandem mass spectra. *Analytical Chemistry*, 77(14), 4626–4639.
53. Geer, L., Markey, S., Kowalak, J., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D., Yang, X., Shi, W., Bryant, S. (2004). Open mass spectrometry search algorithm. *Journal of Proteome Research*, 3(5), 958–964.
54. Xu, H., Freitas, M. (2009). MassMatrix: a database search program for rapid characterization of proteins and peptides from tandem mass spectrometry data. *Proteomics*, 9(6), 1548–1555.
55. Park, C., Klammer, A., Kall, L., MacCoss, M., Noble, W. (2008). Rapid and accurate peptide identification from tandem mass spectra. *Journal of Proteome Research*, 7(7), 624–627.
56. Tabb, D., Fernando, C., Chambers, M. (2007). MyriMatch: highly accurate tandem mass spectral peptide identification by multivariate hypergeometric analysis. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 654–661.
57. Kim, S., Mischerikow, N., Bandeira, N., Navarro, J., Wich, L., Mohammed, S., Heck, A., Pevzner, P. (2010). The generating

function of CID, ETD, and CID/ETD pairs of tandem mass spectra: applications to database search. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(12), 2840–2852.

58. Pappin, D., Hojrup, P., Bleasby, A. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology*, 3(6), 327–332.

59. Mascot software, the benchmark for identification, characterisation and quantitation of proteins using mass spectrometry data. [Electronic resource: <http://www.matrixscience.com>. Date of circulation 07.07.2018]

60. Perkins, D., Pappin, D., Creasy, D., Cottrell, J. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18), 3551–3567.

61. Avtonomov, D., Agron, I., Kononikhin, A., Nikolayev, Ye. (2009). Creation of a database of accurate mass-time marks for a qualitative and quantitative approach in the study of a human urine proteome using isotope labeling. *Proceedings of MFTI*, 1(1), 24–29 p. (In Russian)

62. Scoring Schemes. [Electronic resource: https://edwardslab.bmcb.georgetown.edu/mascot/help/scoring_help.html. Date of circulation 08.06.2018]

63. Protein Digestion. [Electronic resource: <http://proteomicsresource.washington.edu/protocols06/sequest.php>. Date of circulation 13.07.2018]

64. SEQUEST correlates uninterpreted tandem mass spectra of peptides with amino acid sequences from protein and nucleotide databases. [Electronic resource: <http://fields.scripps.edu/sequest/index.html>. Date of circulation 03.04.2018]

65. X! Tandem open source is software that can match tandem mass spectra with peptide sequences, in a process that has come to be known as protein identification. [Electronic resource: <http://www.thegpm.org/tandem>. Date of circulation 11.04.2018]

66. Sparkman, D. (2012). Informatics and mass-spectral databases in the evaluation of environmental mass spectral data. Saint Albans: ILMPublications.—528 p.

67. Joint Center for Computational Biology and Informatics. [Electronic resource: <http://www.jcibi.ru/index.html>. Date of circulation 10.05.2018]

68. Hamm, C., Wilson, W., Harvan, D. (1986). Peptide sequencing program. *Computer Applications in the Biosciences*, 2(2), 115–118.

69. Berizovskaya, E.I., Ihalaynen, A.A., Antohin, A.M., Taranchenko, V.F., Goncharov, V.M., Mitrofanov, D.A., Aksenov, A.V., Rodin, I.A., Shpigun, O.A. (2014). Capability of high resolution electrospray ionization mass spectrometry in the determination of monoisotopic molecular masses of the recombinant human insulin and its analogues *Mass spectrometry*, 11 (4), 231–238. (In Russian)

70. Vostrikova, N.L., Chernukha, I.M., Kulikovskiy, A.V., Shishkin, S.S. (2016). 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. *Foods and Raw Materials*, 4(2), 136–147.

71. 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. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Вострикова Наталья Леонидовна — кандидат технических наук, заведующий лабораторией «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН

109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Тел.: +7-495-676-79-81

E-mail: n.vostrikova@fnpcs.ru

*автор для переписки

Чернуха Ирина Михайловна — доктор технических наук, профессор, главный научный сотрудник Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова, 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Тел.: +7-495-676-63-21

E-mail: imcher@inbox.ru

Хвостов Даниил Владиславович — младший научный сотрудник лаборатории биоаналитических исследований, Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства

143442, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые Горы, владение 1.

Тел. +7-495-561-5264

E-mail: scbmt@yandex.ru

Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.

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

Natal'ya L. Vostrikova — candidate of technical sciences, head of laboratory «Scientific and methodical work, biological and analytical research», V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel.: +7-495-676-79-81

E-mail: n.vostrikova@fnpcs.ru

*corresponding author

Irina M. Chernukha — doctor of technical sciences, professor, leading research scientist of 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, ul. Talalikhina, 26

Tel.: +7-495-676-63-21

E-mail: imcher@inbox.ru

Daniil V. Khvostov — junior researcher of the Laboratory of Bioanalytical Research, Scientific Center for Biomedical Technologies of the Federal Medical-Biological Agency

143442, Moscow region, Krasnogorsk district, Svetlye gory village, 1

Tel. +7-495-561-5264

E-mail: scbmt@yandex.ru

Contribution

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 16.07.2018

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. Gorbатов 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 ± 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 ± 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 ± 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 7,4 IX), количественно переносили в эппендорф, центрифугировали при 5000g в течение 5 мин, отбирали 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 выше 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.

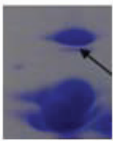
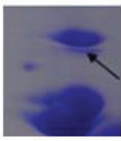
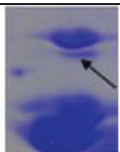
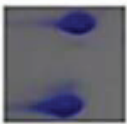
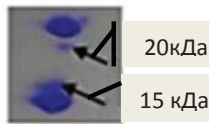
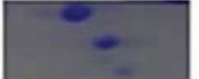
Наименование белка	24 ч	72 ч	120 ч
Пируваткиназа			
Легкие цепи миозина			
Аденилаткиназа			

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

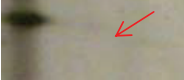
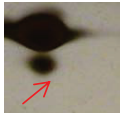
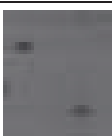
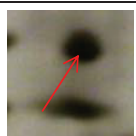
Наименование белка	48 ч	96 ч	168 ч
Пируваткиназа			
Легкие цепи миозина			
Аденилаткиназа			

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/pI (эксп.)**	м/pI (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/pI (эксп.) — полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ, а Мм/pI (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 мышах-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, миозин-новые 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 ± 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 ± 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 ± 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'Farrell was used with isoelectric focusing 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.

Protein	24 h	72 h	120 h
Pyruvate kinase			
Myosin light chains			
Adenylate kinase			

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

Protein	48 h	96 h	168 h
Pyruvate kinase			
Myosin light chains			
Adenylate kinase			

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 μ - 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 μ - 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. 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 — junior researcher, 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@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

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СУБПРОДУКТОВ

Насонова В.В.

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

Ключевые слова: субпродукты, пищевые субпродукты, язык, печень, пищевая ценность, термическая обработка субпродуктов

Аннотация

В статье показана целесообразность использования субпродуктов для пищевых целей как источника полноценного белка и ряда макро- и микронутриентов. Затронуты основные направления использования различных видов субпродуктов. Приведены классификации субпродуктов, которые существуют в различных странах. Показано влияние прижизненных факторов на качество субпродуктов. Одновременно с этим рассмотрены пути оптимального использования субпродуктов в зависимости от вида.

Review paper

PERSPECTIVE WAYS THE USE OF BY-PRODUCTS

Viktoriya V. Nasonova

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

Key words: by-products, EBPs, tongue, liver, nutritional value, heat treatment

Abstract

The article describes rationale for using by-products as a source of high-value protein and a number of macro- and micronutrients. The main directions of using the different types of by-products are discussed. Classifications of by-products in different countries are given. The influence of antemortem factors on the quality of by-products is shown. Simultaneously, the ways of optimal by-product utilization are considered depending on their type.

Введение

Мясо и мясная продукция во всем мире составляют важный сегмент рациона, поскольку они обеспечивают жителей планеты необходимыми питательными веществами, которые невозможно получить употребляя, например, растительную пищу [1]. За последние 20 лет наблюдается повышенный спрос на мясо и мясные продукты в различных частях мира (включая Африку, Азию, Европу, Соединенные Штаты Америки), что обусловлено повышением качества жизни, увеличением доходов населения. Одновременно с этим, все большее внимание стало уделяться не только мясу, но и сбору и обработке побочных продуктов. Согласно данным [2] стоимость побочных продуктов может достигать примерно 10–15 % от стоимости живого животного в странах с развитым животноводством, хотя всего на побочные продукты приходится около 2/3 массы животного после убоя. Продукты убоя в мире разделяются на две большие группы Edible (съедобные, пищевые) и non-edible (несъедобные, непищевые). Съедобные продукты убоя, представлены субпродуктами (печень, почки, язык, сердце и др.), к несъедобным относятся (кератинсодержащее сырье — рога, копыта и др.).

Основная часть

Пищевые, съедобные продукты убоя, еще называемые EBPs — это продукты, которые прошли экспертизу на бойне государственным инспектором и допущены для переработки на пищевые цели. Напротив IEBCPs не допускаются для потребления и направляются на переработку для производства непищевой продукции. Считается, что EBPs, особенно печень, почки, язык и сердце могут обеспечивать необходимыми питательными веществами в тех регионах, где мясо и мясные продукты ограничены или их количество недостаточно для удовлетворения потребностей людей в питании [3]. Поскольку известно, что с увеличением жителей планеты на первый план выходит огромная проблема продовольственной безопасности, изменение климата и нехватка животного белка, особенно в развивающихся странах.

Имеющиеся данные, опубликованные Всемирной Организацией Здравоохранения [4] свидетельствуют о том, что более двух миллиардов человек в мире, особенно в развивающихся странах, испытывают дефицит основных пищевых веществ, таких как витамины и минеральные вещества, в частности витамин А, йод, железо и цинк. Для минимального удовлетворения

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Насонова В.В. Перспективные пути использования субпродуктов. Теория и практика переработки мяса. 2018; 3(3): 64–73. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-64-73

FOR CITATION: Nasonova V.V. Perspective ways the use of by-products. Theory and practice of meat processing. 2018; 3(3): 64–73. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-64-73

потребности этих людей потребуется около 20 г животного белка на человека в день, или 7,3 кг белка в год [4]. Исходя из этого источники белка, такие как ЕВРPs могут быть использованы для снижения угрозы недоедания. Ученые из Нидерландов Oskerman, H.W. и Basu провели исследования пищевой ценности субпродуктов и установили, что они содержат необходимые питательные вещества, такие как витамины группы В, аминокислоты и жирные кислоты, минеральные вещества, которые соответствуют их содержанию в мышечной ткани [5]. Российские ученые на протяжении многих лет занимаются изучением пищевой ценности

мясного сырья и субпродуктов, полученные данные опубликованы в ряде отраслевых справочников [6].

С другой стороны, ИЕВРPs (не пищевые продукты убоя), такие как кости, шкура, кожа, перья, копыта, рога, волосы, щетина и др. после переработки могут быть трансформированы в полезные и ценные продукты для человека или животных [7] (Рис. 1). Известно, что кость может быть переработана в корм для скота, в качестве источника минералов, одновременно с этим кожа/шкура и перья нашли широкое применение в легкой промышленности и текстильной промышленности, одновременно с этим, ряд суб-

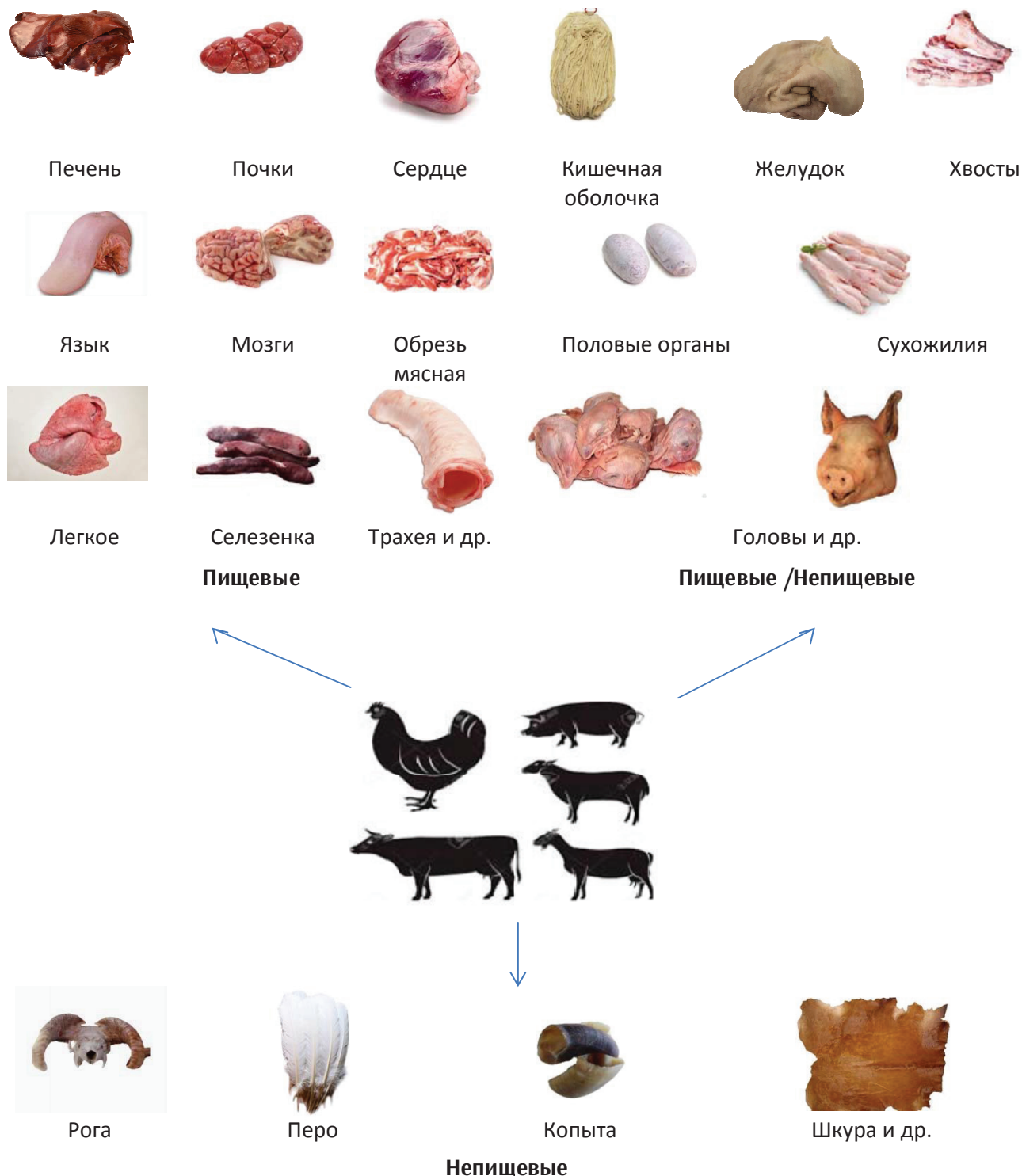


Рис. 1. Пищевые и непищевые продукты убоя

продуктов используется для производства лекарственных препаратов.

Стоит отметить, что классификация побочных продуктов животного происхождения отличается в разных странах. В ряде стран существует разделение на съедобные и несъедобные (пищевые и непищевые), как уже было отмечено выше, в других — на органические и неорганические продукты [7]. Одновременно с этим субпродукты могут быть сгруппированы в три группы: белые субпродукты, темные субпродукты и красные субпродукты [8]. Например, в Великобритании субпродукты подразделяют на красные — печень, легкие, язык, хвост и т.д., белые — жир и мясную обрезь. В России, согласно действующему ГОСТ 32244, субпродукты, в зависимости от вида убойного животного, подразделяют на говяжьи, свиные, барьи и др., а в зависимости от морфологического строения и способов обработки субпродукты подразделяют на мякотные, мясокостные, шерстные и слизистые.

Во всем мире правила по инспектированию субпродуктов довольно схожи и проводятся ветврачом сразу после убоя животного на предмет отсутствия инфекций (например, фиброз, туберкулез и др.) [7]. Также специалист обращает внимание на наличие синяков, если они обнаруживаются в любых органах туши, то пораженные части или даже целые органы обычно изолируются и не поступают на дальнейшую переработку. Кишечное сырье подвергается промывке и обработке, субпродукты инспектируются, в том числе и на предмет наличия поверхностных дефектов, к которым относятся разрезы, наличие бородавок и другие.

Широкое применение субпродукты получили после того, как было проведено большое количество работ доказывающих их высокую пищевую ценность. Они стали широко использоваться в Европе, Южной Америке, Северной Америке, Азии, Африке и Австралии. В Африке все субпродукты используются в пищу, так исследование, проведенное в Сомали, показало, что субпродукты потребляют жители всех возрастов [8]. Как правило, субпродукты подвергаются традиционным способам термической обработки: жарке, варке, тушению с овощами или другими ингредиентами. В некоторых странах из печени готовят паштет, фуа-гру или колбасы [9,10,11]. Это обусловлено не только своеобразными органолептическими характеристиками, но также и высоким содержанием белка, железа, меди и витаминов.

Согласно опросу, проведенному среди 1030 жителей Великобритании, было обнаружено, что люди в возрасте от 18 лет и старше довольно часто употребляют в пищу куриную печень [12]. Одновременно с этим, говяжье сердце и печень являются источниками коэнзима Q10, его содержание в данных видах субпродуктов выше, чем в мышечной ткани. В дополнение к этому, Ercan, P. было установлено, что переваримость Q10

в сердце и печени значительно выше, чем перевариваемость Q10 в мышечной ткани. Коферменты Q10 производятся главным образом в митохондриях, которые показывают, что печень и сердечная мышца содержат более высокие митохондрии, чем другие части мышечной ткани [13].

Известно, что печень является жизненно важным, съедобным органом, который составляет около 1–2% от живой массы крупного рогатого скота и более богат минералами и витаминами по сравнению с мышечной тканью [14]. Исследования показали, что печень говядины содержит от 3,5 до 7,8% жиров. В основном жиры печени жвачных животных содержат более длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты, стеариновую кислоту и менее пальмитиновую кислоту, в отличие от мышц тех же животных [15,16]. Ученые из Южной Кореи Seong и др. установили, что содержание жира в свиной печени сопоставимо с содержанием жира в мышечной ткани крупного рогатого скота [17].

Почки и печень богаты витамином рибофлавином (1,677–3,630 мг/кг), что в 5–10 раз превышает его содержание в мышечной ткани. Одновременно с этим печень — это источник ниацина, витаминов B12, B6, фолатина, аскорбиновой кислоты и витамина A. Считается, что 100 г печени свинины или говядины, позволяют обеспечить от 450–1100 % от требуемого количества витамина A [18].

Белок печени менее функционален, в отличие от белка мышечной ткани, что связано с ионной силой и содержанием водорастворимых белков [19]. Исследования овечьей печени [16] показали наиболее высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в печени в отличие от длиннейшей мышцы спины. Аналогичные исследования, по подтверждению более высокой пищевой ценности печени, а именно с несколько меньшим содержанием в ней насыщенных жирных кислот по сравнению с длиннейшей мышцей спины были проведены учеными из других стран [18]. Учеными Purchas и Busboom было доказано, что печень содержит больше железа, чем мышечная ткань говядины, что подтверждает необходимость потребления печени беременными женщинами и детьми, ввиду обеспечения необходимого содержания в их рационе железа для правильного функционирования крови. Также было обнаружено, что печень содержит умеренное количество таурина, карнозина и креатина в сравнении с мышечной тканью [20].

Сердце содержит большое количество незаменимых аминокислот, каких как треонин, лейцин, лизин и триптофан [20, 21]. Arafa установил, что желудок птицы имеет близкий состав и аминокислотный профиль в сравнении с мясом птицы. Так, куриный желудок имеет высокое содержание белка (26 %) и низкое содержание жира (0,9 %) [22]. Учеными Madruga, M.S. и Dos Santos, M.N. [23] было установлено, что внутрен-

ние органы мелкого рогатого скота содержат сопоставимое с мышечной тканью количество белков, жира, минеральных веществ, таких как фосфор и железо.

Язык позволяет обеспечить рацион полноценным белком и содержит также витамины и минеральные вещества. Язык богат железом, цинком, холином и витамином B12. Исследования, проведенные по обеспечению железом организма, показали, что употребление языка крупного рогатого скота позволяет обеспечить около 28 % и 12 % ежедневного потребления железа для мужчин и женщин соответственно [24]. В связи с этим, языки крупного рогатого скота, свиней и мелкого рогатого скота широко применяются в пищу после предварительной термической обработки: варки, копчения и др. В странах Северной Америки, Африки, Европы и Азии язык крупного рогатого скота относится к деликатесам и рассматривается, как источник полноценного животного белка. Несмотря на это, комплексных исследований, включающих изучение структурно-механических и органолептических свойств языка говядины после термической обработки не проводились.

Изучение яичек говядины и свинины показало, что они относительно богаты жирами, железом, белком и полиненасыщенными жирными кислотами [25]. Rucciarelli, D.L. с коллегами установили, что свиные яички содержат 10,5 % белка, 2,9 % жира и 1,3 % углеводов [26]. Концентрация гемового железа в свиных яичках составляет около 2 мг/100 г продукта, что как минимум в 2,5 раза превышает его содержание в свиной корейке, и в соответствии с рекомендациями Министерства Сельского хозяйства США обеспечивает до 25 % от рекомендуемого уровня суточного потребления для мужчин. Во многих странах мира считается, что употребление семенников и пениса домашнего скота способствует усилению мужской силы [27].

В Великобритании широко используется в пищу селезенка, как правило, ее применяют при производстве колбасных изделий, тогда как на Сицилии селезенка используется для изготовления сэндвичей [28]. Несмотря на это, потребители, все же отдают предпочтение мясу, что может быть обусловлено более доступной информацией о его пищевой ценности, религиозных убеждениях и разнице в цене.

Увеличение населения планеты и, как следствие, увеличение потребности в животном белке будет способствовать возрастанию интереса к переработке и потреблению субпродуктов. В связи с этим необходимо определить факторы, которые способны оказывать влияние на качество субпродуктов.

Выход и качество субпродуктов, так же, как и в целом всех продуктов убоя зависят от множества прижизненных факторов, таких как порода, пол, используемые системы выращивания, вес животного и условий убоя и первичной переработки. Florek с коллегами установили, что изменение выхода субпродуктов напрямую зависит от веса животного, так

животное той же породы и вида с высоким приростом массы тела будет соответственно давать больше килограммов субпродуктов, чем при низких весах [29].

Hoffman с коллегами провели исследование, согласно которому показано значительное влияние породы на пищевую ценность субпродуктов, так печень и язык, полученные от овец породы Меринос отличались более высоким содержанием жира, чем овцы Dorper [30]. Одновременно с этим было установлено, что сердце, почки и селезенка, полученные от овец породы Dorper содержат больше белка, в отличие от овец породы Мерино. Ученые из Китая установили, что пищевая ценность печени крупного рогатого скота породы Wagyu и Qinchuan выше, чем печени, полученной от крупного рогатого скота породы Qinchuan при условии одинаковых условий содержания [14]. Одновременно с этим Puschas с коллегами [20] обнаружили, что минеральный состав, в частности содержание меди, зависит от возраста и пола животного, ими было получено, что содержание меди в печени молочных телят выше, чем в молодняке крупного рогатого скота. Кроме того концентрация меди в печени молочных телят увеличивалась в течение первых двух месяцев, в затем начала снижаться. Исследования по сравнению массы субпродуктов, полученных от птицы различного пола, показали, что вес печени и желудка был выше у курицы, чем у петухов, в то время, как вес сердца у куриц был меньше, чем у петухов [30]. Если сравнивать вес субпродуктов, полученных от буйволов и крупного рогатого скота, то было получено, что сердце, легкие, почки и селезенки полученные от буйволов более тяжелые, в сравнении с этими же субпродуктами, полученными от говядины [19].

При работе с субпродуктами необходимо учитывать, что они относятся к скоропортящейся продукции. Непосредственно после убоя субпродукты промывают чистой проточной водой и отправляют на охлаждение до достижения температуры не выше 6 °C в течение 16 часов или охлаждают при температуре от 0 до 2 °C в течение 7 дней. Конечно, наибольший срок хранения субпродуктов можно получить только при условии их хранения при отрицательных температурах минус 12 °C, минус 18 °C и минус 24 °C в течение 4, 12 и 18 месяцев соответственно [31].

Ввиду особенностей состава субпродуктов, перспективным направлением их использования, помимо пищевых целей, является их применение в фармацевтической промышленности. В настоящее время экстракт печени используется в качестве лекарственного препарата. Широко известный антикоагулянт — гепарин, используемый для предотвращения свертывания крови во время хирургических вмешательств или трансплантации органов, производится из печени, легких и тонкой кишки крупного рогатого скота. В России имеется большое количество наработок по

использованию субпродуктов для производства лекарственных препаратов [32].

Специалисты из Департамента Сельского хозяйства Китайской республики, проведя предварительные исследования, предлагают оптимальное термическое состояние для реализации каждого вида субпродукта, а также способ их тепловой обработки, результаты их исследования приведены в Табл. 1 [18].

Таблица 1. Термическое состояние и способ тепловой обработки субпродуктов

Наименование субпродукта	Термическое состояние	Способ тепловой обработки
Печень	Охлажденное, замороженное	Тушение, жарка
Почки	Охлажденное	Жарка, варка в воде, тушение
Сердце	Охлажденное, замороженное	Тушение, варка в воде
Язык	Охлажденное, замороженное	Варка в воде
Рубец	Охлажденное	Жарка, варка в воде

Introduction

Meat and meat products are important part of the diet all over the world, as they provide people with essential nutrients that cannot be obtained from other food, e.g. vegetables [1]. Over the past 20 years, there has been an increased demand for meat and meat products in various parts of the world (including Africa, Asia, Europe, the United States of America), due to improved quality of life and increased income. At the same time, more attention was paid not only to meat, but also to the collection and processing of by-products. According to [2], in countries with developed livestock, the cost of by-products may amount to about 10–15 % of living animal cost, although after slaughter, by-products comprise about 2/3 of the animal weight. In the world, the slaughter products are divided into two large groups, i.e. edible (food grade) and inedible (non-food grade). Edible slaughter products include by-products (liver, kidney, tongue, heart, etc.), while inedible ones are represented by keratin-containing raw materials (horns, hooves, etc.).

Main part

Edible slaughter products, also called EBPs, are products that have passed evaluation by a state inspector in a slaughterhouse and allowed for processing for food purposes. In contrast, IEBPs are not allowed for human consumption and are processed to produce non-food products. It is recognized that EBPs, especially liver, kidneys, tongue and heart, may provide the necessary nutrients in those regions where access to meat and meat products is limited or their quantity is insufficient to meet the nutritional needs of people [3]. It is known that with the increase in popula-

Закключение

Проведенный анализ литературы обобщающий основные направления использования различных видов субпродуктов с учетом их пищевой ценности, химического состава и других характеристик, показал, что затронутая тема является интересной и безусловно перспективной для дальнейшего изучения, особенно для России. Поскольку, согласно имеющимся статистическим данным, несмотря на увеличение поголовья крупного рогатого скота и свиней, и, как следствие увеличение объема производства субпродуктов, на пищевые цели в России перерабатывается не более 60 % от их объема. Исходя из этого, требуется кардинальный пересмотр структуры их переработки и использования.

Изменение подходов позволит достичь следующих результатов:

- увеличение потребления большего количества животного белка;
- снижение общей себестоимости производимой мясной продукции;
- повышение глубины переработки сырья.

tion, a huge problem of food security, climate change and lack of animal protein is emerging, especially in developing countries.

Available data published by the World Health Organization [4] indicate that more than two billion people in the world, especially in developing countries, have deficiency of essential nutrients such as vitamins and minerals, in particular vitamin A, iodine, iron and zinc. To meet these people's nutritional requirements, at least about 20 g of animal protein per person per day is needed, or 7.3 kg of protein per year [4]. Thus, protein sources such as EBPs may be used to reduce malnutrition. Scientists from the Netherlands, Ockerman, H.W. and Basu conducted a study of by-product nutritional value and found that such products contain essential nutrients such as B vitamins, amino acids, fatty acids, and minerals that correspond to their content in muscle tissue [5]. For many years, Russian scientists have been studied the nutritional value of meat raw materials and by-products, and the data obtained are published in a number of reference books [6].

On the other hand, IEBPs (not-food slaughter products) such as bones, skin, feathers, hooves, horns, hair, hog wool, etc., may be transformed into useful and valuable products for humans or animals [7] (Figure 1). It is known that bone may be processed into livestock feed, as a source of minerals, while skin and feathers are widely applied in consumer goods industry and textile industry, and a number of by-products are used for production of medicines.

It should be noted that the classification of animal by-products differs from country to country. In a number of countries there is a division into edible and inedible (food

and non-food), as already noted above, while in other countries, by-products are classified into organic and inorganic products [7]. Furthermore, by-products may be grouped into three groups: white by-products, dark by-products and red by-products [8]. For example, in the UK, by-products are divided into red ones, i.e. liver, lungs, tongue, tail, etc., and white ones, i.e. fat and meat trimmings. In Russia, according to the current GOST 32244, by-products are divided into beef, pork, sheep, etc. depending on the species of slaughtered animal, and into meat, meat-and-bone, wool and mucous depending on the morphological structure and ways of processing.

Throughout the world, the rules for inspecting by-products are quite similar and the inspection is conducted by veterinarian immediately after the slaughter to exclude infections (e.g., fibrosis, tuberculosis, etc.) [7]. Also, the specialist draws attention to the presence of bruises. If they are found in any organs of the carcass, the affected parts or even entire organs are usually isolated and discarded. The intestinal raw material is subjected to washing and processing, by-products are inspected, particularly for surface defects, which include cuts, warts etc.

Wide use of by-products began after a large number of works supporting their high nutritional value. They

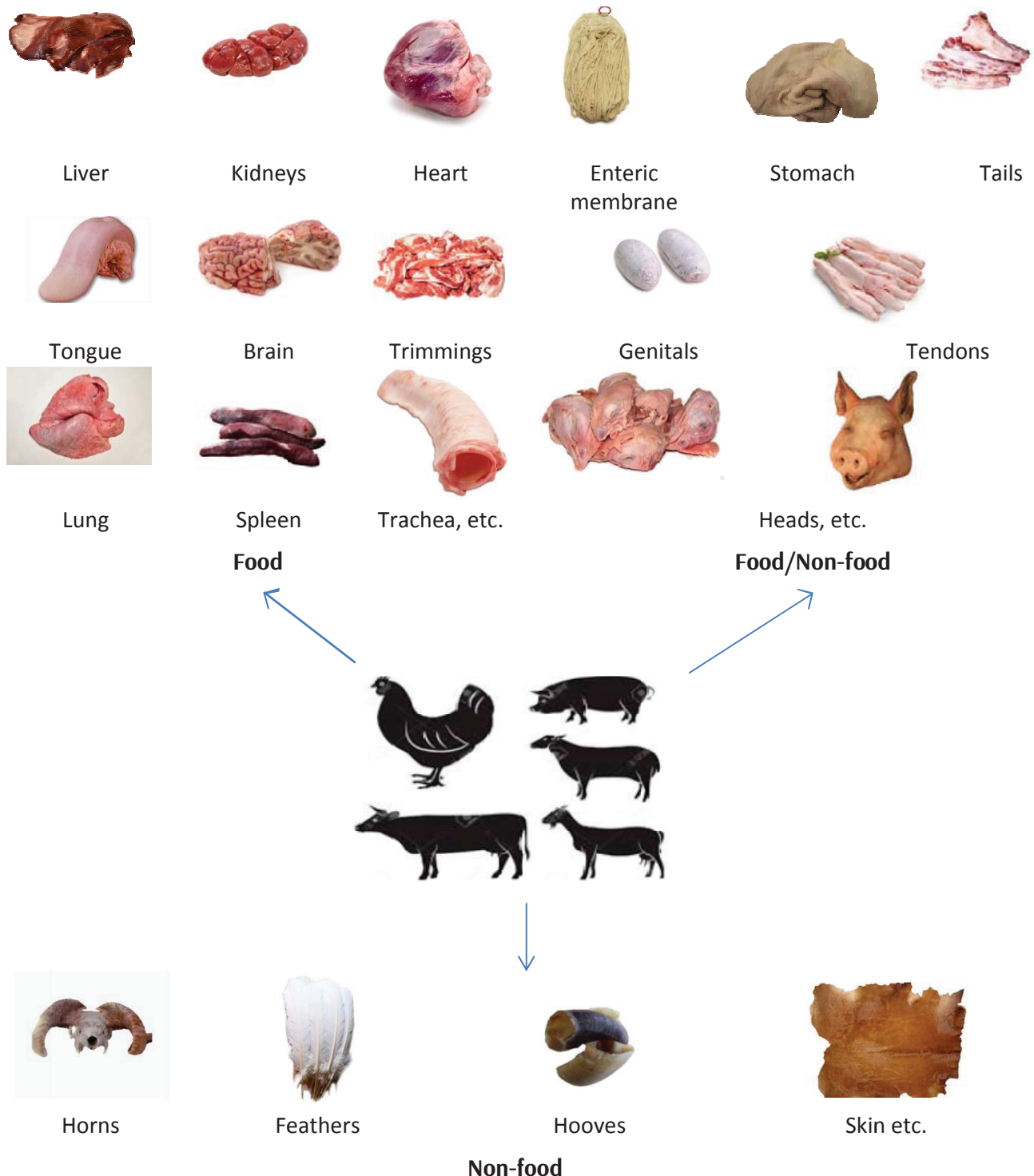


Figure 1. Food and non-food slaughter products

have become widely used in Europe, Americas, Asia, Africa and Australia. In Africa, all by-products are used for food. The study conducted in Somalia has shown that by-products are consumed by people of all ages [8]. Typically, by-products are exposed to traditional methods of heat treatment: frying, cooking, stewing with vegetables or other ingredients. In some countries, pate (foie gras) or sausages are prepared from the liver [9, 10, 11]. This is not only due to the specific sensory properties, but also due to the high content of protein, iron, copper and vitamins.

According to a survey of 1,030 UK residents, it was found that people aged over 18 years often eat chicken liver [12]. At the same time, beef heart and liver are sources of coenzyme Q10, and its content in these types of by-products is higher than in muscle tissue. In addition, Ercan, P. found that the digestibility of Q10 in the heart and liver is significantly higher than in muscle tissue. Coenzyme Q10 is produced mainly in mitochondria, which shows that the heart and liver contain more active mitochondria than the muscle tissue [13].

It is known that liver is a vital organ, which is about 1–2 % of cattle live weight and is higher in mineral and vitamin content compared to muscle tissue [14]. Studies have shown that beef liver contains 3.5 to 7.8 % fat. In general, liver fats of ruminant animals contain longer-chain polyunsaturated fatty acids, stearic acid and palmitic acid, in contrast to the muscles of the same animals [15, 16]. Scientists from South Korea, Seong et al., found that the fat content in pork liver is comparable to bovine muscle tissue [17].

Kidneys and liver are rich in riboflavin, i.e. 1,677 to 3,630 mg/kg, which is 5–10 times higher than in muscle tissue. At the same time, liver is the source of niacin, vitamins B12, B6, folacin, ascorbic acid and vitamin A. It is recognized that 100 g of pork or beef liver provide 450 to 1100 % of the reference daily intake for vitamin A [18].

Liver protein is less functional, in contrast to muscle protein, which is associated with ionic strength and the content of water-soluble proteins [19]. Studies of lamb liver [16] showed higher content of polyunsaturated fatty acids in the liver compared to *Longissimus dorsi* muscle. Similar studies on the confirmation of a higher nutritional value of liver, i.e. slightly lower content of saturated fatty acids in comparison with *Longissimus dorsi* muscle, were conducted by scientists from other countries [18]. Purchas and Busboom showed that liver contains more iron than beef muscle tissue, which confirms the need for liver consumption by pregnant women and children to provide adequate iron intake for the proper blood functioning. It was also found that liver contains a moderate amount of taurine, carnosine and creatine in comparison with muscle tissue [20].

Heart contains a large number of essential amino acids, such as threonine, leucine, lysine, and tryptophan [20, 21]. Arafa found that poultry stomach has a close composition and amino acid profile compared to poultry meat. Thus,

chicken stomach has a high protein content (26 %) and a low fat content (0.9 %) [22]. Madruga, M.S. and Dos Santos, M.N. [23] found that the internal organs of small cattle contain a comparable to muscle tissue amount of proteins, fat, and minerals, such as phosphorus and iron.

Tongue allows to provide the diet with a high-value protein and also contains vitamins and minerals. It is rich in iron, zinc, choline and vitamin B12. Studies on iron intake showed that tongue of cattle may comprise about 28 % and 12 % of daily iron consumption for men and women, respectively [24]. In this regard, tongue of cattle, pigs and small cattle are widely used as food after heat treatment: cooking, smoking, etc. In the countries of North America, Africa, Europe and Asia, tongue of cattle is considered as delicacy and is a source of high-value animal protein. Despite this, complex studies involving evaluation of structural, mechanical and organoleptic properties of beef tongue after heat treatment have not been conducted.

The study of beef and pork testes showed that they are relatively rich in fat, iron, protein and polyunsaturated fatty acids [25]. Pucciarelli, D.L. et al. found that pork testes contain 10.5 % protein, 2.9 % fat and 1.3 % carbohydrates [26]. The concentration of heme iron in pork testes is about 2 mg/100 g of product, which is at least 2.5 times higher than in pork loin, and in accordance with the recommendations of the US Department of Agriculture, provides up to 25 % of the recommended daily intake for men. In many countries of the world it is believed that the use of testes and penis of livestock contributes to the strengthening of male potency [27].

In the UK, spleen is widely used for food, mainly in the production of sausages, while in Sicily, spleen is used in sandwiches [28]. Despite this, consumers still prefer meat, which may be due to more information about its nutritional value, religious beliefs and price difference.

An increase in the world's population and, as a consequence, in the demand for animal protein will contribute to an increase in interest in processing and consumption of by-products. In this regard, it is necessary to identify factors that may affect their quality.

Yield and quality of by-products, as well as all slaughter products in general, depend on a variety of antemortem factors such as breed, sex, breeding systems used, animal weight and conditions of slaughter and primary processing. Florek et al. found that by-product yield directly depends on animal weight, i.e. animal of the same breed with a high body weight gain will give more by-products than animal with low weight [29].

Hoffman et al. conducted a study that showed the significant effect of the breed on the nutritional value of by-products, i.e. liver and tongue from Merino sheep had higher fat content than from Dorper sheep [30]. Simultaneously, it was found that heart, kidney and spleen from Dorper sheep contain a higher protein content compared to Merino sheep. Scientists from China determined that under the same conditions, the nutritional

value of liver from Wagyu and Qinchuan cattle is higher than from Qinchuan cattle [14]. Puschas et al. [20] found that the mineral composition, in particular copper content, depends on the age and sex of the animal, and that copper content in liver of veal calves is higher than in young cattle. In addition, copper concentration in liver of veal calves increased during the first two months, and then began to decline. Studies comparing the weight of by-products from poultry of various sex showed that the weight of liver and stomach was higher in chickens than in cocks, while the weight of heart in chickens was less than that in cocks [30]. Comparison of the weight of by-products obtained from buffaloes and cattle revealed that heart, lungs, kidneys and spleens from buffaloes are heavier compared to the same by-products obtained from cattle [19].

When working with by-products, it is necessary to take into account that they are perishable products. Immediately after slaughter, by-products are washed with clean running water and cooled down to a temperature not more than 6 °C for 16 hours or cooled at a temperature of 0 to 2 °C for 7 days. Long shelf life of by-products may only be obtained if stored at negative temperatures of minus 12 °C, minus 18 °C, and minus 24 °C for 4, 12, and 18 months, respectively [31].

Due to the composition of by-products, the promising direction of their use apart from food purposes is pharmaceutical industry. Currently, liver extract is used as a medicine. The widely recognized anticoagulant, heparin, used to prevent blood clotting during surgical interventions or organ transplantation, is produced from the liver, lungs and small intestine of cattle. In Russia, there are large

number of methods for using by-products in the production of medicines [32].

After preliminary studies, specialists from the Department of Agriculture, Republic of China, found the optimal thermal state for each by-product sale, as well as the method of their heat treatment; the results are given in Table 1 [18].

Table 1. Thermal state and method for heat treatment of by-products

By-product	Thermal state	Heat treatment
Liver	Cooled, frozen	Stewing, frying
Kidneys	Cooled	Frying, boiling in water, stewing
Heart	Cooled, frozen	Stewing, boiling in water
Tongue	Cooled, frozen	Boiling in water
Rumen	Cooled	Frying, boiling in water

Conclusion

The literature analysis summarizing the main directions of using different types of by-products, taking into account their nutritional value, chemical composition and other parameters, showed that the problem under discussion is interesting and promising, especially for Russia. According to available statistics, despite the increase in the number of cattle and pigs, and, as a consequence, the increase in the volume of by-product production, in Russia, no more than 60 % of their amount is processed for food purposes. Thus, a cardinal revision of the structure of their processing and use is required.

Changing approaches will achieve the following results:

- increase in animal protein intake;
- decrease in production cost of meat products;
- increase in processing rate of raw materials.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Byers, T., Nestle, M., Mctiernan, A., Doyle, C., Currie-Williams, A., Gansler, T., Thun, M. (2002). American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for Cancer Prevention: Reducing the Risk of Cancer with Healthy Food Choices and Physical Activity. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians*, 52(2), 92–119.
2. Irshad, A., Sharma, B.D. (2015). Abattoir By-Product Utilization for Sustainable Meat Industry: A Review. *Journal of Animal Production Advances*, 5(6), 681–696.
3. Fayemi, P.O., Muchenje, V., Yetim, H., Ahmed, A. (2016). Targeting the Pains of Food Insecurity and Malnutrition Among Internally Displaced Persons with Nutrient Synergy and Analgesics in Organ Meat. *Food Research International*, 104, 48–58.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Meat Consumption. (2014). [Electronic resource: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/background.html> Access data: 14.06.2018]
5. Ockerman, H.W., Basu, L. By-Products. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 2nd ed.; Devine, C., Dikeman, M., Eds. Amsterdam: Academic Press: Amsterdam.—2014. pp. 104–112. ISBN: 9780123847317
6. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник / Под ред. член-корр. МАИ, проф. И. М. Скурихина и академика РАМН, проф. В. А. Тутельяна. М, ДеЛи принт.—236 с. ISBN5–94343–028–8
7. Alao, B.O., Falowo, A.B., Chulayo, A., Muchenje, V. (2017). The Potential of Animal By-products in Food Systems: Production, Prospects and Challenges. *Sustainability (Switzerland)*, 9(7), 1089.
8. Alexandre, G., Liméa, L., Nepos, A., Fleury, J., Lallo, C., Archimede, H. (2010). The Offal Components and Carcass Measure-

- ments of Creole Kids of Guadeloupe under Various Feeding Regimes. *Livestock Research for Rural Development*, 22(5).
9. Masese, L., Waweru, J. Knowledge, Attitudes and Practices Study on Offal Consumption among the Somali Population. [Electronic resource: <http://www.enonline.net/fex/41/knowledge> Access data: 07.06.2018]
10. Abu-Salem, F.M., Abou Arab, E.A. (2010). Chemical properties, microbiological quality and sensory evaluation of chicken and duck liver paste (foie gras). *Grasas y Aceites*, 61(2), 126–135.
11. Lorenzo, J.M., Pateiro, M. (2013). Influence of Fat Content on Physico-Chemical and Oxidative Stability of Foal Liver Pâté. *Meat Science*, 95(2), 330–335.
12. Xiong, G., Han, M., Kang, Z., Zhao, Y., Xu, X., Zhu, Y. (2016). Evaluation of protein structural changes and water mobility in chicken liver paste batters prepared with plant oil substituting pork back-fat combined with pre-emulsification. *Food Chemistry*, 196, 388–395.
13. Ercan, P., El, S.N. (2011). Changes in Content of Coenzyme Q10 in Beef Muscle, Beef Liver and Beef Heart with Cooking and In Vitro Digestion. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(8), 1136–1140.
14. Li, R.R., Yu, Q.L., Han, L., Cao, H. (2014). Nutritional Characteristics and Active Components in Liver from Wagyu _ Qinchuan Cattle. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(2), 214–220.
15. Chan, W., Brown, J., Lee, S.M., Buss, D.H. (Ed.) (1995). Meat, Poultry and Game. Fifth Supplement to the Fifth Edition of McCance and Widdowson's. The Composition of Foods. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London

16. Enser, M., Hallett, K.G., Hewett, B., Fursey, G.A.J., Wood, J.D., Harrington, G. (1998). The Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Beef and Lamb Liver. *Meat Science*, 49(3), 321–327.
17. Seong, P.N., Park, K.M., Cho, S.H., Kang, S.M., Kang, G.H., Park, B.Y., Moon, S.S., Van Ba, H. (2014). Characterization of Edible Pork By-Products By Means of Yield and Nutritional Composition. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(3), 297–306.
18. Deng-Cheng Liu, D. — C. (2002). Better Utilization of By-products from the Meat Industry. [Electronic resource: <http://www.ffc.agnet.org/library.php?func=view&id=20110706135001> Access data: 19.06.2018]
19. Zouari, N., Fakhfakh, N., Amara-Dali, W.B., Sellami, M., Msaddak, L., Ayadi, M.A. (2011). Turkey Liver: Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Protein Fractions. *Food and Bioprocess Processing*, 89, 142–148.
20. Purchas, R.W., Aungsupakorn, R. (1993). Further Investigations into the Relationship between Ultimate Ph and Tenderness for Beef Samples from Bulls and Steers. *Meat Science*, 34(2), 163–178.
21. Gaudy, N., Landis, J. (1973). Effect of Different Heat Treatments of Some Carcasses Parts on the Total Amino Acids Content and that in Enzyme Hydrolysates. *Mitteilungen-aus-dem-Gebieteder-Lebensmitteluntersuchungund-Hyg.*, 64, 133–138.
22. Arafa, A.S. (1977). Pickled Chicken Gizzards: 1. Acceptability and Proximate Analysis. *Poultry Science*, 56(3), 1014–1017.
23. Madruga, M. S., dos Santos, M. N., Costa, R. G., de Medeiros, A. N., Queiroga do Egypto, R. C., Schuller, A. R., Albuquerque, C. L. C., Galvão, M. S., Cavalcanti, R. N., Amorim Campos, R. J. (2007).

- Fat components from precooked “Buchada”: an edible goat meat by-product. *CYTA — Journal of Food*, 5(4), 265–270.
24. The Advantages of Eating Cow Tongue. [Electronic resource: <https://www.livestrong.com/article/534633-the-advantages-of-eating-cow-tongue/> Access data: 10.06.2018]
25. Holman, R.T., Hofstetter, H.H. (1965). The Fatty Acid Composition of the Lipids from Bovine and Porcine Reproductive Tissues. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 42(6), 540–544.
26. Pucciarelli, D.L., Friesen, C.A., Schroeder, A.L. (2012). New culinary uses for pork testicles from immunologically castrated male pigs. *FASEB Journal*, 26(1), 636–646.
27. Rotenberg, R. (2008). Udders, Penises, and Testicles. *Ethnology*, 47(1–2), 123–128.
28. Nollet, L.M.L., Toldra, F. (2011). Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products. CRC Press.— 471 p. ISBN978–1–4398–0360–8
29. Florek, M., Litwińczuk, Z., Skalecki, P., Kędzierska-Matysek, M., Grodzicki, T. (2012). Chemical Composition and Inherent Properties of Offal from Calves Maintained Under Two Production Systems. *Meat Science*, 90(2), 402–409.
30. Hoffman, L.C., Laubscher, L.L., Leisegang, K. (2013). Nutritional Value of Cooked Offal Derived from Free-Range Rams Reared in South Africa. *Meat Science*, 93(3), 696–702.
31. Meatupdate, Storage Life of Meat. [Electronic resource: <http://www.meatupdate.csiro.au/Storage-Life-of-Meat.pdf> Access data: 18.05.2018]
32. Лисицын, А.Б., Небурчилова, Н.Ф., Петрунина, И.В., Чернова, А.С. (2015). Использование субпродуктов в медицинских целях. *Все о мясе*, 2, 6–9.

REFERENCES

1. Byers, T., Nestle, M., Mctiernan, A., Doyle, C., Currie-Williams, A., Gansler, T., Thun, M. (2002). American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for Cancer Prevention: Reducing the Risk of Cancer with Healthy Food Choices and Physical Activity. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians*, 52(2), 92–119.
2. Irshad, A., Sharma, B.D. (2015). Abattoir By-Product Utilization for Sustainable Meat Industry: A Review. *Journal of Animal Production Advances*, 5(6), 681–696.
3. Fayemi, P.O., Muchenje, V., Yetim, H., Ahhmed, A. (2016). Targeting the Pains of Food Insecurity and Malnutrition Among Internally Displaced Persons with Nutrient Synergy and Analgesics in Organ Meat. *Food Research International*, 104, 48–58.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Meat Consumption. (2014). [Electronic resource: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/background.html> Access data: 14.06.2018]
5. Ockerman, H.W., Basu, L. By-Products. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 2nd ed.; Devine, C., Dikeman, M., Eds. Amsterdam: Academic Press: Amsterdam.—2014. pp. 104–112. ISBN: 9780123847317
6. Chemical composition of Russian food products: Handbook / Ed. Corresponding Member. MAI, prof. IM Skurikhin and Academician of RAMS, prof. V. A. Tutelyan. M: DeLi print.— 236 p. ISBN5–94343–028–8
7. Alao, B.O., Falowo, A.B., Chulayo, A., Muchenje, V. (2017). The Potential of Animal By-products in Food Systems: Production, Prospects and Challenges. *Sustainability (Switzerland)*, 9(7), 1089.
8. Alexandre, G., Liméa, L., Nepos, A., Fleury, J., Lallo, C., Archimede, H. (2010). The Offal Components and Carcass Measurements of Creole Kids of Guadeloupe under Various Feeding Regimes. *Livestock Research for Rural Development*, 22(5).
9. Masese, L., Waweru, J. Knowledge, Attitudes and Practices Study on Offal Consumption among the Somali Population. [Electronic resource: <http://www.enonline.net/fex/41/knowledge> Access data: 07.06.2018]
10. Abu-Salem, F.M., Abou Arab, E.A. (2010). Chemical properties, microbiological quality and sensory evaluation of chicken and duck liver paste (foie gras). *Grasas y Aceites*, 61(2), 126–135.
11. Lorenzo, J.M., Pateiro, M. (2013). Influence of Fat Content on Physico-Chemical and Oxidative Stability of Foal Liver Pâté. *Meat Science*, 95(2), 330–335.
12. Xiong, G., Han, M., Kang, Z., Zhao, Y., Xu, X., Zhu, Y. (2016). Evaluation of protein structural changes and water mobility in chicken liver paste batters prepared with plant oil substituting pork back-fat combined with pre-emulsification. *Food Chemistry*, 196, 388–395.
13. Ercan, P., El, S.N. (2011). Changes in Content of Coenzyme Q10 in Beef Muscle, Beef Liver and Beef Heart with Cooking and

- In Vitro Digestion. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(8), 1136–1140.
14. Li, R.R., Yu, Q.L., Han, L., Cao, H. (2014). Nutritional Characteristics and Active Components in Liver from Wagyu _ Qinchuan Cattle. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(2), 214–220.
15. Chan, W., Brown, J., Lee, S.M., Buss, D.H. (Ed.) (1995). Meat, Poultry and Game. Fifth Supplement to the Fifth Edition of McCance and Widdowson's. The Composition of Foods. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London
16. Enser, M., Hallett, K.G., Hewett, B., Fursey, G.A.J., Wood, J.D., Harrington, G. (1998). The Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Beef and Lamb Liver. *Meat Science*, 49(3), 321–327.
17. Seong, P.N., Park, K.M., Cho, S.H., Kang, S.M., Kang, G.H., Park, B.Y., Moon, S.S., Van Ba, H. (2014). Characterization of Edible Pork By-Products By Means of Yield and Nutritional Composition. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(3), 297–306.
18. Deng-Cheng Liu, D. — C. (2002). Better Utilization of By-products from the Meat Industry. [Electronic resource: <http://www.ffc.agnet.org/library.php?func=view&id=20110706135001> Access data: 19.06.2018]
19. Zouari, N., Fakhfakh, N., Amara-Dali, W.B., Sellami, M., Msaddak, L., Ayadi, M.A. (2011). Turkey Liver: Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Protein Fractions. *Food and Bioprocess Processing*, 89, 142–148.
20. Purchas, R.W., Aungsupakorn, R. (1993). Further Investigations into the Relationship between Ultimate Ph and Tenderness for Beef Samples from Bulls and Steers. *Meat Science*, 34(2), 163–178.
21. Gaudy, N., Landis, J. (1973). Effect of Different Heat Treatments of Some Carcasses Parts on the Total Amino Acids Content and that in Enzyme Hydrolysates. *Mitteilungen-aus-dem-Gebieteder-Lebensmitteluntersuchungund-Hyg.*, 64, 133–138.
22. Arafa, A.S. (1977). Pickled Chicken Gizzards: 1. Acceptability and Proximate Analysis. *Poultry Science*, 56(3), 1014–1017.
23. Madruga, M. S., dos Santos, M. N., Costa, R. G., de Medeiros, A. N., Queiroga do Egypto, R. C., Schuller, A. R., Albuquerque, C. L. C., Galvão, M. S., Cavalcanti, R. N., Amorim Campos, R. J. (2007). Fat components from precooked “Buchada”: an edible goat meat by-product. *CYTA — Journal of Food*, 5(4), 265–270.
24. The Advantages of Eating Cow Tongue. [Electronic resource: <https://www.livestrong.com/article/534633-the-advantages-of-eating-cow-tongue/> Access data: 10.06.2018]
25. Holman, R.T., Hofstetter, H.H. (1965). The Fatty Acid Composition of the Lipids from Bovine and Porcine Reproductive Tissues. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 42(6), 540–544.

26. Pucciarelli, D.L., Friesen, C.A., Schroeder, A.L. (2012). New culinary uses for pork testicles from immunologically castrated male pigs. *FASEB Journal*, 26(1), 636–646.
27. Rotenberg, R. (2008). Udders, Penises, and Testicles. *Ethnology*, 47(1–2), 123–128.
28. Nollet, L.M.L., Toldra, F. (2011). *Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products*. CRC Press.— 471 p. ISBN978–1–4398–0360–8
29. Florek, M., Litwińczuk, Z., Skalecki, P., Kędzierska-Matysek, M., Grodzicki, T. (2012). Chemical Composition and Inherent Properties of Offal from Calves Maintained Under Two Production Systems. *Meat Science*, 90(2), 402–409.

30. Hoffman, L.C., Laubscher, L.L., Leisegang, K. (2013). Nutritional Value of Cooked Offal Derived from Free-Range Rams Reared in South Africa. *Meat Science*, 93(3), 696–702.
31. Meatupdate, Storage Life of Meat. [Electronic resource: <http://www.meatupdate.csiro.au/Storage-Life-of-Meat.pdf> Access data: 18.05.2018]
32. Lisitsyn, A.B., Neburchilova, N.F., Petrunina, I.V., Chernova, A.S. (2015). The direction of use of an offal in the medical purposes. *Vsyo o myase*, 2, 6–9.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Насонова Виктория Викторовна — кандидат технических наук, руководитель отдела, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26.
Тел.: +7–495–676–65–51
E-mail: v.nasonova@fncps.ru

Критерии авторства

Полностью подготовила рукопись и несет ответственность за плагиат

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.06.2018

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Viktoriya V. Nasonova — candidate of technical sciences, chef of department, V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7–495–676–65–51
E-mail: v.nasonova@fncps.ru

Contribution

Completely prepared the manuscript and is responsible for plagiarism

Conflict of interest

The author declare no conflict of interest.

Received 27.06.2018

ПРИЖИЗНЕННОЕ ОБОГАЩЕНИЕ БАРАНИНЫ ЭССЕНЦИАЛЬНЫМИ МИКРОЭЛЕМЕНТАМИ С ЦЕЛЬЮ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ

Гиро Т.М.^{1*}, Горлов И.Ф.^{2,3}, Сложенкина М.И.^{2,3}, Козлов С.В.¹, Тасмуханов Н.В.¹

¹ Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

² Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции, Волгоград, Россия

³ Волгоградский государственный технический университет, Волгоград, Россия

Ключевые слова: кормовые добавки, эссенциальные микроэлементы, алиментарная недостаточность, йододефицит, здоровое питание, функциональные продукты

Аннотация

Для обеспечения профилактических мер по устранению проблемы дефицита микроэлементов разработан новый биологически безопасный и эффективный метод обогащения баранины с использованием в рационах скота кормовых добавок, содержащих йод и селен в органической форме. Отмечено увеличение содержания йода, селена и цинка в мясе животных опытных групп, выращенных с применением обогащенных рационов, причем более значительная локализация элементов зафиксирована в мясе баранчиков, получавших кормовую добавку «Йоддар-Zn» совместно с селеноорганическим препаратом «ДАФС-25» (Zn – 980 мкг/100 г; Se — 53,9 мкг/100 г; I — 77,6 мкг/100 г). Таким образом, в 100 г *m. longissimus dorsi* содержится соответственно 8,2; 77,0 и 51,7 % от установленного уровня потребности в этих элементах, что обосновывает целесообразность дальнейшего использования данного сырья для выработки мясных продуктов функционального назначения. На основании более значительной локализации микроэлементов в мясе баранчиков, получавших совместно «Йоддар-Zn» и «ДАФС-25», из сырья этой группы были изготовлены сыровяленые снеки. В процессе технологической обработки содержание цинка в продукте снизилось на 21,3 %, селена на — 16,3 %, йода — на 26,5 % и составило 771 мкг/100 г, 39,72 мкг/100 г и 57,01 мкг/100 г соответственно, что позволяет удовлетворить суточную потребность в них на 6,4; 56,7 и 38,0 % (из расчета на 100 г продукта). Потери цинка в снеках, упакованных под вакуумом, в процессе хранения в течение 3 месяцев составили 11,3 %, селена — 12,6 %, йода — 14,3 % от исходного. Содержание цинка в 100 г готового продукта по истечению 3 месяцев хранения составило 5,7; селена — 49,6; йода — 32,6 % от установленного уровня потребности. Проведены исследования физиологического воздействия сыровяленых снеков на организм лабораторных животных. Выявлено стимулирующее влияние селена и йода на гемопозитическую функцию опытных животных. В ходе исследования функциональной активности щитовидной железы установлено, что у животных опытных групп содержание тиреотропного гормона в сыворотке крови достоверно выше, чем у крыс из контрольной.

Original scientific paper

IN VIVO ENRICHMENT OF THE LAMB OF ESSENTIAL TRACE ELEMENTS FOR ITS USE IN THE TECHNOLOGY OF FUNCTIONAL FOODS

Tatiana M. Giro^{1,*}, Ivan F. Gorlov^{2,3}, Marina I. Slozhenkina^{2,3}, S.V. Kozlov¹, N.V. Tasmuchanov¹

¹ Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov, Saratov, Russia

² Volga region research institute of meat-and-milk production and processing, Volgograd, Russia

³ Volgograd State Technical University, Volgograd, Russia

Key words: feed supplements, essential microelements, nutritional deficiency, iodine deficiency, healthy diet, functional products.

Abstract

To provide preventive measures for solving the problem of micronutrient deficiency, a new effective biologically safe method of enrichment lamb through the intervention of the cattle rations with feed supplements containing iodine and selenium in organic form has been developed. An increase in the iodine, selenium and zinc content in meat of the test animals fed enriched diets was noted, with more significant localization of elements to be registered in the meat from the ram lamb fed the «Yoddar-Zn» feed supplement together with organic selen preparation «DAFS-25» (Zn - 980 mg/100g; Se — 53.9 mg/100 g; I — 77.6 mg/100 g). So, 100 g of *m.*

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Гиро Т.М., Горлов И.Ф., Сложенкина М.И., Козлов С.В., Е.Ю., Тасмуханов Н.В. Прижизненное обогащение баранины эссенциальными микроэлементами с целью ее использования в технологии функциональных продуктов. Теория и практика переработки мяса. 2018; 3(3): 74–88. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-74-88

FOR CITATION: Giro T.M., Gorlov I.F., Slozhenkina M.I., Kozlov S.V., Tasmuchanov N.V. In vivo enrichment of the lamb of essential trace elements for its use in the technology of functional foods. Theory and practice of meat processing. 2018; 3(3): 74–88. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-74-88

longissimus dorsi contained 8.2; 77.0 and 51.7 % of the recommended daily intake of these elements, respectively, that proved the feasibility of further output of the functional products with balanced essential nutrients. Based on the data on greater localization of microelements in meat from the ram lamb fed «Yoddar-Zn» with «DAFS-25», we made jerked snacks from the raw materials obtained from the animals of this test group. In processing, the zinc content in the product decreased by 21.3 %, iodine — 26.5 %, selenium — 16.3 % and made 771 mg/100 g, 39.72 mg/100 g, and 57.01 mg/100 g, respectively, that met the daily norm for 6.4; 56.7 and 38.0 % (for 100 g of product). In the vacuum-packed snacks, the loss of zinc was 11.3 %, iodine — 14.3 %, selenium — 12.6 % from the original content. After 3 months of storage, the zinc content in 100 g of the finished products was 5.7; selenium — 49.6; iodine — 32.6 % of the daily requirement. Investigations of physiological effect of the jerked snacks on the body of the laboratory animals were performed. Stimulating effect of selenium and iodine on the hematopoietic function of the experimental animals was revealed. The study of the functional activity of the thyroid gland found that the experimental animals' content of thyroid stimulating hormone in blood serum was significantly higher than that of the control rats.

Введение

В свете проекта «Основы государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года» одной из главных задач является выполнение комплекса мероприятий, направленных на создание условий, обеспечивающих удовлетворение, в соответствии с требованиями медицинской науки, потребностей различных групп населения в здоровом питании с учетом их традиций, привычек и экономического положения [1]. На сегодняшний день разработана «Концепция развития производства функциональных продуктов в РФ», предусматривающая использование прогрессивных методов получения органического животноводческого сырья с определенными функциональными характеристиками и составом путем прижизненного формирования функционально-технологических свойств. При этом для обеспечения нормальной жизнедеятельности и повышения продуктивности животных необходимо создание прочной кормовой базы за счет разработки сбалансированных рационов кормления по комплексу основных питательных веществ и минеральных добавок по недостающим макро- и микроэлементам [2]. Проблема качества кормов имеет мировой масштаб и требует более пристального внимания к управлению технологической цепью «корм-продукция-потребитель» [3]. Таким образом, решая проблему здоровья животных, мы в конечном итоге решаем проблему здоровья человека и нации в целом [4,5].

Обеспечение потребителя мясными продуктами функциональной направленности должно осуществляться через взаимосвязанную последовательность отдельных звеньев единой трофологической цепи «от поля до прилавка», придание продукту функциональных свойств — посредством направленного прижизненного формирования заданных характеристик животноводческого сырья, используемого в их производстве [6]. Такой подход позволяет обогащать продукты эссенциальными нутриентами, исключив риск передозировки. Как известно, минеральные вещества являются структурным материалом при формировании тканей, органов, входят в состав органических веществ, участвуют в процессах дыхания, кроветворения, переваривания, всасывания, синтеза, расхода

и выделения продуктов обмена из организма, взаимосвязаны с деятельностью многих биологически активных веществ и, в целом, воздействуют на обмен веществ и многочисленные физиологические функции организма. Высокую значимость в обменных процессах организма имеют йод, селен и цинк. В связи с этим применение органических форм данных элементов в составе белково — углеводных комплексов в кормлении сельскохозяйственных животных является одним из наиболее безопасных и недорогих методов получения, обогащенного мясного и молочного сырья [7,8].

Одним из способов получения баранины высокого качества, обеспечивающей человека необходимыми микроэлементами, является прижизненная оптимизация химического состава мяса путем коррекции рационов за счет обогащения их эссенциальными нутриентами [6]. Применения белково-углеводного комплекса с органической формой йода и селена способствует повышению перевариваемости и усвояемости кормов, стимуляции роста и развития животных, повышению неспецифического иммунитета, что в совокупности ведет к высокой продуктивности и улучшению качества получаемого мясного сырья [7].

Поэтому, оптимизация рационов овец кормовыми добавками, содержащими йод и селен в органической форме для производства баранины, обогащенной микроэлементами с целью ее использования в рецептурах продуктов функциональной направленности, является актуальной задачей, для реализации программы продовольственной безопасности Российской Федерации.

С целью прижизненной оптимизации химического состава мяса для дальнейшего производства функциональных продуктов из баранины авторами была поставлена задача изучить эффективность использования в кормлении баранчиков кормов, обогащенных органическими формами йода, селена и цинка («Йоддар-Zn» и «ДАФС-25»).

«Йоддар-Zn» (рег. № ПВР-2-10.9/02488 от 29.12.2014) в качестве действующего вещества содержит йодированные белки коровьего молока, органические соединения цинка (аминокислоты). «ДАФС-25» (ТУ 9337-001-26880895-96) — органическая форма селена, полученная путем химического синтеза.

Объекты и методы

Опыт проводился на базе СПК колхоз «Романовский» Саратовской области. Выращивание ягнят осуществлялось кошарно-базовым методом. С 4,5-х месячного возраста всех животных поставили на 4-х месячный интенсивный нагул на естественные пастбища (окончание нагула — в 8,5 месячном возрасте). Для проведения опыта в отаре ягнят ставропольской породы в возрасте 4,5 месяцев по методу аналогов были сформированы четыре группы подопытных животных по 10 голов в каждой. Кормовые добавки вносили дополнительно к основному рациону согласно инструкции по применению один раз в сутки вместе с зерновыми кормами (ячменная дерть) в количестве 10 % от их количества. Дозировка «Йоддар-Zn» — 100 г на 1 тонну корма, «ДАФС-25» — из расчета 1,6 мг на 1 кг корма в составе премиксов. Контрольная группа получала к основному рациону только ячменную дерть в количестве 250–300 грамм на голову в сутки (ОР); I опытная — ячменную дерть + кормовую добавку «Йоддар-Zn»; II опытная — ячменную дерть + селенорганический препарат «ДАФС-25»; III опытная — ячменную дерть + «Йоддар-Zn» + «ДАФС-25» (Табл. 1).

Во всех опытах применены идентичные способы транспортировки и предубойной подготовки животных. В конце опыта (255 суток) по методике ВИЖ 1985 года был произведен контрольный убой 40 подопытных животных в условиях СПК колхоз «Романовский» Саратовской области.

На разделку и обвалку туши направляли в охлажденном состоянии через 24 ч. после убоя. Для исследований отбирали образцы *m. longissimus dorsi* контрольной и опытных групп, упаковывали в полиэтилен-полиамидную пленку и проводили исследования по ниже описанным методам.

Минеральный состав мышечной ткани баранины и готовых изделий характеризовали по наличию и содержанию микроэлементов (Se, Zn, I). При определении минерального состава руководствовались ГОСТами (ГОСТ 26927–86, ГОСТ 26930–86) и инструкциями, рекомендованными научным Советом по аналитическим методам (НСАМ 3х, 160х, 172х, 138х, 450с). Определение макро- и микроэлементов вели методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

Таблица 1. Схема эксперимента (n = 10)

Группа	Контроль	I опытная	II опытная	III опытная
Кормовая добавка	ОР	ОР + «Йоддар-Zn»	ОР + «ДАФС-25»	ОР + «Йоддар-Zn» + «ДАФС-25»

Таблица 2. Схема эксперимента (n=6)

Характеристика групп	Контроль	I опытная	II опытная	III опытная
Состояние животных в начале эксперимента	клинически здоровые			
Рацион лабораторных животных	ОР	ОР + чипсы (I)	ОР + чипсы (Se)	ОР + чипсы (I-Se)
Объем введения	—	3–5	3–5	3–5
Режим введения	—	Дробно 2 раза в день	Дробно 2 раза в день	Дробно 2 раза в день

С целью оценки биологической ценности и профилактического эффекта сыровяленых снеков из баранины, обогащенных эссенциальными микронутриентами, проведены биологические исследования влияния функциональных продуктов на обменные процессы в организме животных. В качестве лабораторных моделей были использованы крысы-самцы линии Вистар (Wistar) массой 50–65 г. Для опыта были сформированы по принципу аналогов четыре группы по 6 животных в каждой. Контрольная группа получала обычный виварный рацион (ОР); I опытная — дополнительно сыровяленые снеки из баранины, обогащенной йодом (I); II опытная — снеки из баранины, обогащенной селеном (Se); III опытная — снеки из баранины, обогащенной йодом и селеном (I-Se). Схема эксперимента приведена в Табл. 2.

Исследования выполняли согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708н от 23.08.2010 г.) и методическим указаниям с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» (2012). Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS123). Strasbourg, 1986). Исследования осуществляли согласно утвержденному письменному протоколу и в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП).

Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по проведению биологических исследований на лабораторных животных. Вновь прибывшие животные находились на карантине в течение 7 суток в клетках в отдельном помещении. Во время карантинного периода у животных контролировали клинические показатели состояния здоровья. Животных содержали в виварии согласно санитарным правилам и на стандартном рационе в соответствии с Приказом МЗ СССР № 1045–73 от 06.04.1973, Правилами лабораторной практики и При-

казом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 в поликарбонатных клетках по 6 животных в каждой. В качестве подстилки использовали древесные опилки. Крыс содержали отдельно (в отдельных помещениях). Для кормления использовался сухой брикетированный корм ПК-120 ГОСТ Р 51849–2011 Р.5 (ООО «Лабораторкорм», г. Москва). Для питья использовалась водопроводная вода, которую давали *ad libitum* из стандартных поилок. Температуру (20–22 °С) и влажность (60–70 %) воздуха контролировали в каждом помещении ежедневно и показания документировали. В помещениях поддерживалось естественно-искусственное освещение (12 ч свет/12 ч темнота). Подбор животных в группы проводили произвольно методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10 %. Животных взвешивали на весах РА2102С (ОНАУС). Масса животных указана в период введения препаратов. Каждое животное имело отчетливую метку (раствором пикриновой кислоты); на этикетке на клетке указано название опыта, его продолжительность, номер группы, количество животных, ответственное лицо. В течение 70 суток проводили наблюдение за общим состоянием и поведением животных; ежедневно регистрировали клиническое состояние животных, отмечали особенности поведения, приема корма и воды; учитывали состояние волосяного покрова, слизистых и т.д. Опытных и контрольных животных взвешивали перед введением препарата, а также еженедельно до окончания опыта. По окончании эксперимента у всех животных проводили отбор проб крови в вакуумные пробирки для *in vitro* диагностики «Improvacuter» (Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd, China). Для гематологических исследований отбирали по 0,5 мл крови в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА, для биохимических — по 1–2 мл в пробирки с использованием тромбина в качестве активатора сгустка.

Морфологический состав крови исследовали на гематологическом анализаторе HemaScreen Vet (Hospitex Diagnostics, Italy). Биохимические показатели сыворотки крови (содержание общего белка, альбуминов, кальция, фосфора, магния, калия, глюкозы, холестерина, активность амилазы, аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы) определяли на биохимическом анализаторе BA-88A Mindray (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, China), с использованием наборов реагентов производства «Hospitex Diagnostics» (Italy). Гормональный статус ис-

следуемых животных определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, с использованием диагностических систем «ГР-ИФА» ООО «ХЕМА», на автоматическом планшетном фотометре PLATE SCREEN, «Hospitex Diagnostics» (Italy).

Статистическую обработку полученных результатов по динамике изменений гематологических и биохимических показателей сыворотки крови и показателей мочи проводили по стандартным процедурам, с помощью приложения Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp. USA) и пакета статистического анализа данных StatPlus 2009 Professional 5.8.4 for Windows (StatSoft Inc., USA), с использованием *t*-критерия Стьюдента для оценки достоверности различий между выборками для опытных и контрольных экспериментов. По результатам вычисления среднеарифметического и стандартного отклонения для данной выборки определяли стандартную ошибку среднеарифметического и границы его доверительного интервала с учетом коэффициента Стьюдента $t(n, p)$ при уровне значимости 95 % ($p = 0,05$) и числе измерений. Оценку достоверности различий между средними значениями в опытных и контрольных экспериментах проводили по величине *p*-value в варианте двух-выборочного непарного *t*-теста (two-sample unpaired *t*-test) с неравными дисперсиями. Различия принимали достоверными при выполнении неравенства $P \geq 0,05$. Кроме того, в этих случаях контролировали также соблюдение неравенства $t, t(n, p)$ при $n = (df + 1)$ (где *df* — число степеней свободы), $p = 0,05$,

$$\text{где } t = \frac{|x_1 - x_2|}{(s_1^2 + s_2^2)^{1/2}},$$

где x_1 и x_2 — среднеарифметические значения, s_1 и s_2 — их стандартные ошибки для двух выборок экспериментальных данных [9].

Результаты и обсуждение

Содержание цинка, йода и селена в баранине находится в прямой зависимости от содержания этих микроэлементов в рационах, причем более значительная их локализация зафиксирована в мясе баранчиков третьей опытной группы (Табл. 3).

Таким образом, установлено, что обогащение рационов органическими формами селена и йода в технологии выращивания мелкого рогатого скота является перспективным и актуальным и позволяет получить баранину с высокой пищевой и биологической ценностью (Рис. 1).

Таблица 3. Содержание микроэлементов в 100 г в зависимости от рациона кормления

Показатель	Контроль	I опытная	II опытная	III опытная	Установленный уровень потребности в сутки*
Цинк, мкг	0,492 ± 0,11	0,806 ± 0,14	0,470 ± 0,10	0,980 ± 0,12	9,5–15,0
Селен, мкг	9,8 ± 0,23	13,4 ± 0,17	19,3 ± 0,19	53,9 ± 0,41	30,0–75,0
Йод, мкг	68,5 ± 0,26	76,40 ± 0,18	68,60 ± 0,23	77,60 ± 0,31	130,0–200,0

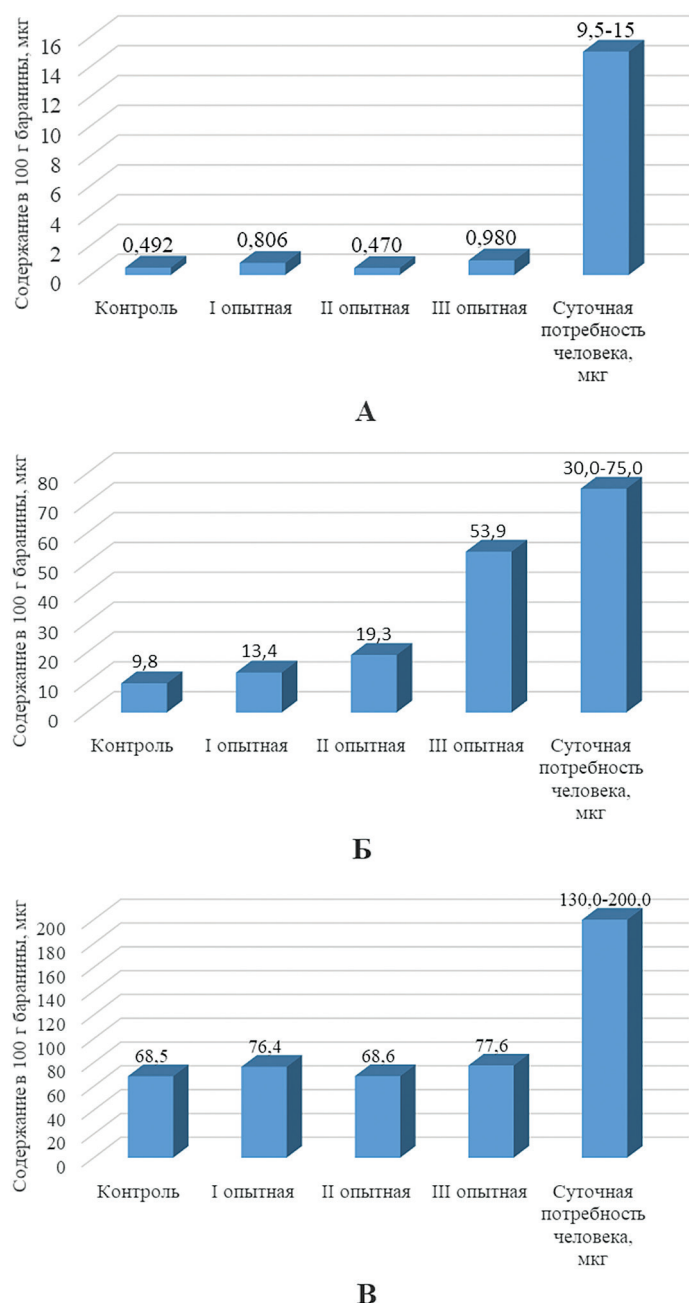


Рис. 1. Содержание в 100 г баранины в зависимости от рациона кормления: (А) цинка, (Б) селена, (В) йода

Для изучения динамики изменения концентрации микроэлементов в процессе технологической обработки при производстве продукции из баранины были выработаны снеки из *m. longissimus dorsi* баранчиков различных групп.

Установлено, что содержание йода в *m. longissimus dorsi* баранчиков I опытной группы, получавших дополнительно «Йоддар-Zn», превышало содержание в контрольной группе на 11,53 % ($P < 0,001$); содержание цинка — на 63,82 % ($P < 0,001$). Содержание селена в *m. longissimus dorsi* баранчиков II опытной группы, получавших дополнительно «ДАФС-25», было выше, чем в контрольной на 96,94 % ($P < 0,001$). Содержание селена в мышце *m. longissimus dorsi* баранчиков III опытной группы, получавших совместно «Йоддар-Zn» и «ДАФС-25», в 5,5 раз ($P < 0,001$) превышало его

содержание в контроле, а содержание йода и цинка — на 13,29 % ($P < 0,001$) и 99,19 % ($P < 0,001$). На основании более значительной локализации микроэлементов в баранине III опытной группы из сырья этой группы были изготовлены чипсы сыровяленные «Волжские» (ТУ 9213-012-00493497-2012).

Для изготовления сыровяленых чипсов «Волжские» баранину (длиннейшая мышца спины, тазобедренная часть, глазной мускул) подмораживают, нарезают на слайсере на тонкие кусочки, солят мокрым способом и сушат в климат-камере при 30 °С и относительной влажности воздуха 75–78 % до приобретения продуктом необходимых потребительских свойств. Упаковку чипсов производили на вакуумной линии типа Multivac R530 и Supervac, используя пакеты типа Cryovac TM-DLY9235. Технология позволяет хранить чипсы при температуре 12–15 °С в течение 6 месяцев в закрытой упаковке.

Анализ результатов химического состава сыровяленых чипсов, обогащенных микроэлементами, свидетельствует об их высокой пищевой ценности (Табл. 4).

Таблица 4.
Физико-химические показатели чипсов «Волжские»

Наименование продукта	Наименование показателя			
	Массовая доля белка, %	Массовая доля жира, %	Массовая доля влаги, %	Массовая доля поваренной соли, %
Чипсы «Волжские»	48,5	11,0	38,7	1,8

Изучение динамики изменения концентрации микроэлементов в снеках показало, что в процессе технологической обработки содержание цинка в продукте снизилось на 21,3 %, йода — на 26,5 %, селена на — 16,3 % и составило 0,771 мкг/кг, 57,01 мкг/100 г и 39,72 мкг/100 г соответственно ($P < 0,001$).

В связи с тем, что сыровяленные снеки — продукт длительного хранения, было изучено влияние сроков хранения на потери микроэлементов. Установлено, что потери цинка в снеках, упакованных под вакуумом, в процессе хранения в течение 3 месяцев снизилось на 11,3 %, йода — на 14,3 %, селена — на 12,6 % от исходного и составили 6,84 мкг/кг; 34,72 мкг/100 г и 48,86 мкг/100 г соответственно (Табл. 5).

Таблица 5.
Динамика содержания микроэлементов в 100 г продуктов

Показатель	В мясном сырье	После технологической обработки	После хранения в течении 3 мес
Цинк, мкг	0,980 ± 0,12	0,771 ± 0,23	0,684 ± 0,15
Селен, мкг	53,90 ± 0,41	39,72 ± 0,42	34,72 ± 0,17
Йод, мкг	77,60 ± 0,31	57,01 ± 0,22	48,86 ± 0,21

Таким образом, содержание цинка в сыровяленых снеках «Волжские» по истечению 3 месяцев хранения составило 5,7; селена — 49,6%; йода — 32,6% от суточной потребности (Рис. 2), что в данном случае для йода и селена соответствует принципам обогащения: 15–50% в усредненной суточной порции (100 г) от физиологической нормы.

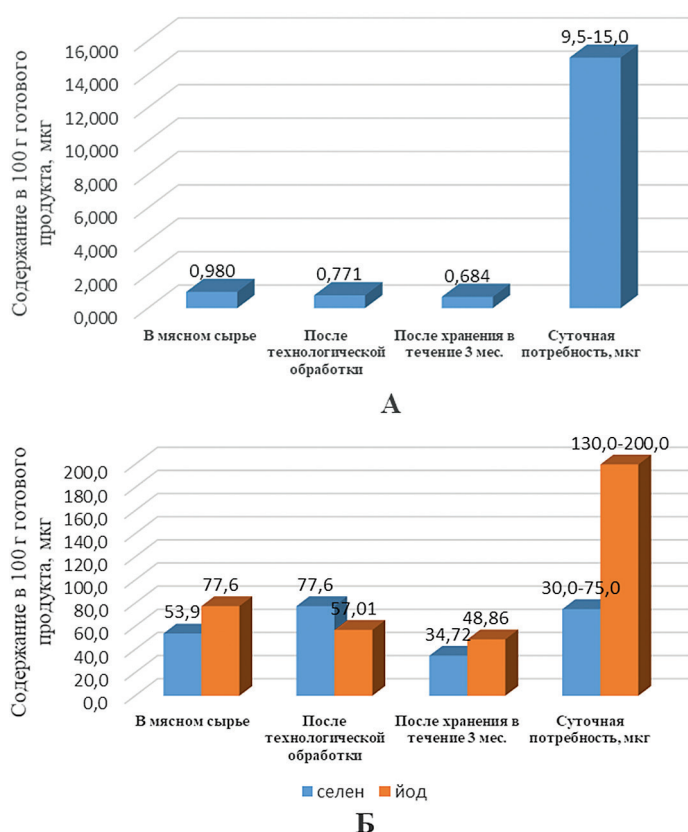


Рис. 2. Динамика содержания (А) цинка, (Б) селена и йода в 100 г готового продукта в процессе хранения

Таблица 6. Общий анализ крови лабораторных животных (n=6)

№ п/п	Показатель	Ед.изм	I опытная	II опытная	III опытная	Контроль
1	WBC	x109/L	7,97 ± 2,67	11,78 ± 1,38*	13,47 ± 0,80*	7,12 ± 0,73
2	LYM	x109/L	4,70 ± 1,96	7,92 ± 0,98*	8,60 ± 0,59*	3,72 ± 0,41
3	MID	x109/L	1,73 ± 0,48	2,08 ± 0,20*	2,42 ± 0,25*	1,28 ± 0,12
4	GRA	x109/L	1,53 ± 0,24	1,78 ± 0,24	2,45 ± 0,17	2,12 ± 0,34
5	LYM	%	55,00 ± 5,89	66,70 ± 1,01*	63,63 ± 1,85*	52,46 ± 2,81
6	MID	%	22,40 ± 2,05*	17,90 ± 0,82	17,83 ± 1,24	17,88 ± 0,76
7	GRA	%	22,60 ± 4,02	15,40 ± 0,90*	18,53 ± 1,23*	29,66 ± 2,95
8	RBC	x109/L	8,07 ± 0,41	7,51 ± 0,25	7,11 ± 0,29	7,18 ± 0,26
9	HGB	g/L	121,33 ± 6,98*	115,83 ± 3,15*	107,50 ± 3,31	101,20 ± 4,21
10	MCHC	g/L	295,67 ± 6,89	305,33 ± 2,94	307,50 ± 3,51	298,40 ± 2,77
11	MCH	Pg	15,03 ± 0,12	15,45 ± 0,20*	15,17 ± 0,33*	14,10 ± 0,29
12	MCV	fl	50,80 ± 1,01*	50,60 ± 1,10*	49,30 ± 0,63	47,22 ± 0,65
13	RDW-CV	%	14,53 ± 0,75	14,47 ± 0,45	14,20 ± 0,13	13,96 ± 0,21
14	RDW-SD	fl	37,00 ± 2,71	36,60 ± 1,30*	35,00 ± 0,55*	32,94 ± 0,60
15	HCT	%	41,00 ± 1,53*	37,95 ± 1,03*	35,00 ± 1,20	33,90 ± 1,18
16	PLT	x109/L	615,33 ± 90,29	620,17 ± 87,68	587,50 ± 30,20	519,20 ± 80,24
17	MPV	fl	6,43 ± 0,17	6,15 ± 0,13	5,92 ± 0,14	6,22 ± 0,16
18	PDW	fl	4,50 ± 0,55	5,07 ± 0,26	4,57 ± 0,20	4,84 ± 0,12
19	PCT	%	0,40 ± 0,20	0,38 ± 0,06	0,35 ± 0,02	0,32 ± 0,07
20	P-LCR	%	8,10 ± 1,01	7,10 ± 1,04	5,83 ± 1,41	7,02 ± 0,86

*P ≤ 0,05 относительно контроля

Таким образом, оптимизация кормления мелкого рогатого скота по цинку, йоду и селену путем обогащения их рационов кормовыми добавками «Йоддар-Zn» и «ДАФС-25» оказало положительное влияние не только на качество мясного сырья, но и способствовало получению обогащенной микроэлементами баранины для функционального питания. Разработанная технология сыровяленых снеков, обогащенных органическими формами цинка, селена и йода, позволит частично компенсировать дефицит этих микроэлементов в питании населения. Так, учитывая, что в среднем суточная потребность взрослого человека в цинке — 12 мкг/сут., в йоде — 150 мкг/сут., в селене — 70 мкг/сут., потребление в сутки 100 г снеков будет способствовать компенсации суточной потребности по цинку — на 5,7%; по йоду — на 32,6%; по селену — на 49,6%.

В ходе проведения эксперимента *in vivo* с целью изучения физиологического воздействия разработанного продукта на живой организм установлено, что в группах крыс, которым в состав рациона вводили продукты, обогащенные селеном, а также селеном в сочетании с йодом, общее количество лейкоцитов достоверно выше по сравнению с контрольной группой (Табл. 6). Данные изменения коррелируют прямо пропорционально с количеством лимфоцитов и средних клеток в периферической крови, что свидетельствует о повышении резистентности у животных. Наряду с этим выявлены достоверно более высокие показатели концентрации гемоглобина и, как следствие, более высокие показатели среднего содержания гемоглобина в эритроцитах, а также среднего объема эритроцитов у животных данных групп по сравнению с контролем. Данный факт указывает на стимулирующее влияние селена и йода на гемопоэти-

Таблица 7. Биохимический анализ крови лабораторных животных (n=6)

№ п/п	Показатель	Ед.изм	I опытная	II опытная	III опытная	Контроль
1	АсТ	Ед./л	101,10 ± 12,29	146,85 ± 9,91*	124,20 ± 22,49	84,10 ± 12,94
2	АлТ	Ед./л	118,20 ± 4,43*	123,72 ± 4,97*	120,40 ± 16,95*	80,10 ± 8,37
3	Белок общий	г/л	143,30 ± 29,73	132,67 ± 13,50*	106,10 ± 13,41	89,23 ± 12,67
4	Глюкоза	ммоль/л	12,20 ± 2,35*	8,79 ± 0,40*	8,40 ± 1,12*	3,52 ± 0,45
5	Амилаза	Ед./л	547,80 ± 32,72*	529,00 ± 18,68*	558,40 ± 59,83*	394,54 ± 39,03
6	Кальций	ммоль/л	2,40 ± 0,10	2,61 ± 0,22	2,7 ± 0,15	2,79 ± 0,31
7	Фосфор	ммоль/л	2,00 ± 0,32	1,72 ± 0,18	1,60 ± 0,18	2,19 ± 0,24
8	Магний	ммоль/л	1,30 ± 0,17	1,25 ± 0,06	1,30 ± 0,19	1,35 ± 0,06
9	Холестерин	ммоль/л	2,30 ± 0,06	2,24 ± 0,06*	2,50 ± 0,19*	3,82 ± 0,52
10	Калий	ммоль/л	5,40 ± 0,60*	4,64 ± 0,57	5,40 ± 0,53*	3,92 ± 0,29
11	Альбумин	г/л	9,2 ± 4,84*	19,35 ± 8,94	20,50 ± 7,41	26,9 ± 3,59
12	Липаза	Ед./л	23,1 ± 2,72	21,50 ± 1,19	34,10 ± 7,62	22,68 ± 2,35

*P ≤ 0,05 относительно контроля

Примечание: АсТ — аспартатаминотрансфераза

АлТ — аланинаминотрансфераза

Таблица 8. Гормональный скрининг лабораторных животных (n=6)

№ п/п	Показатель	Ед.изм	I опытная	II опытная	III опытная	Контроль
1	Тиреотропный гормон	МкЕД/мл	3,00 ± 0,67	2,85 ± 0,51*	2,55 ± 0,56	2,52 ± 0,29
2	Трийодтиронин	нмоль/л	1,43 ± 0,20*	1,55 ± 0,41	2,23 ± 0,56*	3,92 ± 0,50
3	Общий тироксин	нмоль/л	34,13 ± 7,16*	40,32 ± 5,12*	47,98 ± 5,48*	67,84 ± 5,93

ческую функцию костного мозга в организме опытных животных.

Кроме того, в ходе биохимических исследований крови установлены достоверно более высокие показатели активности трансаминаз (АлТ и АсТ) в опытных группах животных по сравнению с контролем (Табл. 7).

Данные изменения прямо пропорционально коррелируют с показателями общего белка, глюкозы и активности амилазы в сыворотке крови. Это указывает на повышение конверсии питательных веществ корма у подопытных животных, о чем свидетельствует также повышение сывороточного белка у животных, которым в состав рациона вводили продукты, обогащенные эссенциальными микроэлементами. Повышение конверсии питательных веществ корма привело к увеличению аминокислот, которые являются субстратом для переаминирования, что приводит к активации трансаминаз в пределах физиологических границ нормы. Аминотрансферазы отщепляют от аминокислот аминокислоты и переносят их на акцепторные молекулы с последующим образованием незаменимых и заменимых аминокислот, используемых как источник энергии. О повышении энергетического метаболизма в организме опытных групп животных можно судить по активности амилазы и концентрации глюкозы в сыворотке крови, которые у данных животных также возрастают относительно контроля. Однако данные показатели не выходят за референсные значения для данного вида животных.

В ходе исследования функциональной активности щитовидной железы установлено, что у животных опытных групп концентрация тиреотропного гормона в сыворотке крови достоверно выше, чем у крыс из контрольной (Табл. 7).

Учитывая тот факт, что тиреотропин регулирует функцию щитовидной железы, данное изменение можно расценивать как положительное влияние продуктов, обогащенных эссенциальными микроэлементами, на функциональную активность щитовидной железы и как следствие на метаболические процессы в организме животных. Данный факт подтверждается динамикой прироста живой массы подопытных и контрольных крыс (Рис. 3).

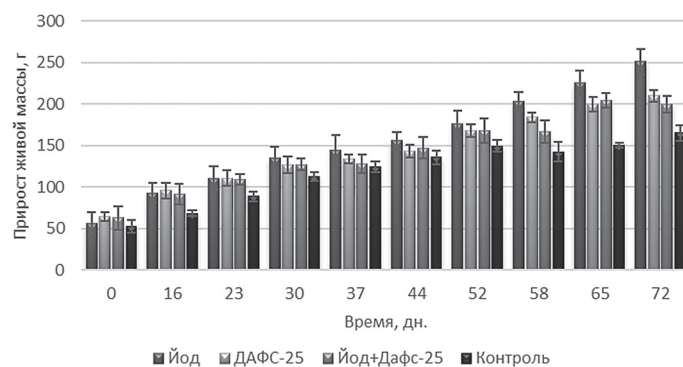


Рис. 3. Динамика живой массы подопытных крыс, г

Так в ходе эксперимента установлено, что динамика прироста живой массы крыс, в состав рациона которых входили снэки из баранины, обогащенные как йодом, так и селеном, и йодом и селеном совместно, была достоверно выше, чем в контрольной группе животных.

Выводы

Таким образом, оптимизация рационов мелкого рогатого скота по цинку, йоду и селену путем обогащения рационов кормовыми добавками «Йоддар-Зп» и «ДАФС-25» оказало положительное влияние не только на продуктивность животных, но и спо-

способствовало получению баранины для дальнейшего производства функциональных мясных продуктов. Разработана технология сыровяленых снеков из баранины, обогащенных органическими формами цинка, селена и йода. Экспериментально обосновано положительное влияние разработанных снеков из баранины, обогащенной йодом, селеном и цинком, на метаболические процессы в организме подопытных животных, что подтверждает целесообразность их использования при коррекции белкового, углеводного, жирового и минерального обменов веществ. Указанные микроэлементы, входящие в состав данного продукта, обладают высокой биодоступностью, что способствует нормализации физиологических функций организма при алиментарной недостаточности.

Introduction

Within the project «Fundamentals of the state policy of the Russian Federation in the field of healthy nutrition of the population for the period up to 2020» one of the main tasks is to implement the set of measures aimed at creating conditions that ensure the satisfaction, in accordance with the requirements of medical science, of the needs of different groups population in healthy nutrition, taking into account their traditions, habits and economic situation [1]. Today has been developed the «Concept of development of production of functional products in the Russian Federation», providing use of progressive methods of receiving organic livestock raw materials with certain functional characteristics and structure by lifetime formation of functional and technological properties. At the same time, to ensure normal life and to increase the productivity of animals, it is necessary to create a solid food base by developing balanced diets for the complex of basic nutrients and mineral supplements for the missing macro — and microelements [2]. The problem of feed quality has a global scale and requires more attention to the management of the technological chain «feed-product-consumer» [3]. Thus, solving the problem of animal health, we ultimately solve the problem of human health and the nation as a whole [4,5].

Providing the consumer with meat products of functional orientation should be carried out through an interconnected sequence of individual links of a single trophic chain «from the field to the counter», giving the product functional properties — through the directed lifetime formation of the given characteristics of livestock raw materials used in their production [6]. This approach allows to enrich products with essential nutrients, eliminating the risk of overdose. As you know, minerals are a structural material in the formation of tissues, organs, are part of organic substances involved in the processes of respiration, hematopoiesis, digestion, absorption, synthesis, consumption and release of metabolic products from the body, are interrelated with the activities of many biologically active substances and, generally, affect the metabolism and nu-

Создание отечественных мясных продуктов, обогащенных микроэлементами актуально, обеспечит население диетическими продуктами с высокими органолептическими и функциональными свойствами. Их производство имеет важное медико-социальное значение для профилактики дефицита микроэлементов в организме, повышения иммунитета, нормализации обмена веществ и эндокринной системы. Продукты рекомендуется использовать для коррекции белкового, углеводного, жирового и минерального обменов веществ.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Проект № 15–16–10000).

merous physiological functions of the body. Iodine, selenium and zinc have high importance in the metabolic processes of the body. In this regard, the use of organic forms of these elements as part of protein-carbohydrate complexes in the feeding of farm animals is one of the safest and most cheap methods of obtaining enriched meat and dairy raw materials [7,8].

One of the ways to produce high quality mutton, which provides a person with the necessary microelements, is the lifetime optimization of the chemical composition of meat by correcting diets by enriching them with essential nutrients [6]. Application of protein-carbohydrate complex with organic form of iodine and selenium contributes to increased digestibility and digestibility of feed, stimulation of growth and development of animals, increased nonspecific immunity, which together leads to high productivity and improve the quality of meat raw materials [7].

Therefore, the optimization of sheep diets with feed supplements containing iodine and selenium in organic form for the production of lamb enriched with trace elements for its use in the formulations of products of functional orientation is an urgent task for the realization of the food security program of the Russian Federation.

In order to optimize the chemical composition of meat in vivo for the further production of functional products from mutton, the authors set the task to study the efficiency of the use of feeds enriched with organic forms of iodine, selenium and zinc («Yoddar-Zn» and «DAFS-25») in feeding lamb.

«Yoddar-Zn» (reg. № PVR-2–10.9/02488 from 29.12.2014) as an active ingredient contains iodized cow's milk proteins, organic zinc compounds (amino acids). «DAFS-25» (TU9337–001–26880895–96) is an organic form of selenium obtained by chemical synthesis.

Objects and methods

The experiment was conducted on the basis of SPK collective farm «Romanovsky» Saratov region. The rearing of lambs was carried out by the koshary-base method. From

Table 1. Scheme of the experiment (n=10).

Group	Control	I experimental	II experimental	III experimental
feed additive	MD	main diet (MD) + «Yoddar-Zn»	main diet (MD) + «DAFS-25»	main diet (MD) + «Yoddar-Zn» + «DAFS-25»

Table 2. Scheme of the experiment (n=6)

Characteristic of groups	Control	I experimental	II experimental	III experimental
Animal condition at the beginning of the experiment	clinically healthy			
Diet of laboratory animals	main diet (MD)	main diet (MD) + snacks (I)	main diet (MD) + snacks (Se)	main diet (MD) + snacks (I-Se)
The amount of introduction	—	3–5	3–5	3–5
Mode of introduction	—	fractional 2 times a day	fractional 2 times a day	fractional 2 times a day

4.5 months of age, all animals were put on a 4 — month intensive feeding on natural pastures (the end of feeding-at 8.5 months of age). To conduct the experiment in the flock of Stavropol breed lambs at the age of 4.5 months by the method of analogues four groups of experimental animals of 10 heads each were formed. Feed supplements were added in addition to the main diet according to the instructions for use once a day along with grain feed (barley turf) in an amount of 10 % of their quantity. Dosage «Yoddar-Zn» –100 g per 1 ton of feed, «DAFS — 25» — at the rate of 1.6 mg per 1 kg of feed in the premix. The control group received to the main diet only barley turf in the amount of 250–300 grams per head in a day day (MD); I experimental — barley turf + feed additive «Yoddar-Zn»; II experimental-barley turf + selenorganic drug «DAFS-25»; III experimental-barley turf + «Yoddar-Zn» + «DAFS-25» (Table. 1).

Identical methods of transportation and pre-slaughter preparation of animals were used in all experiments. At the end of the experiment (255 days) by the method of VISION1985 control slaughter of 40 experimental animals in the conditions of SEC collective farm «Romanovsky» of the Saratov region was made.

The butchering and deboning of the carcasses were sent in a refrigerated state after 24 h after slaughter. For research were selected samples of *m. longissimus dorsi* of the control and experimental groups, Packed in polyethylene-polyamide film and conducted research at the below described methods.

The mineral composition of muscle tissue of lamb and finished products was characterized by the presence and content of trace elements (Se, Zn, I). In determining the mineral composition was guided by the state Standards (GOST 26927–86, GOST 26930–86) and recommended instructions by the scientific Council on analytical methods (NCAY3, 160x, 172x, 138x, 450C). Determination of macro-and microelements was carried out by atomic absorption spectroscopy.

In order to assess the biological value and preventive effect of dried lamb snacks enriched with essential micronutrients, biological studies of the effect of functional products on metabolic processes in animals were conducted. As laboratory models were used male rats of Wistar (Wistar) weighing 50–65 g. For the experiment, was formed on the principle of analogues of the four groups of 6 animals each. The control group received the usual Vivar diet (RR); I ex-

perimental-additional dry-cured snacks of lamb enriched with iodine (I); II experimental-lamb snacks enriched with selenium (Se); III experimental — lamb snacks enriched with iodine and selenium (I-Se). The scheme of the experiment is shown in Table 2.

The studies were performed in accordance with the «Rules of laboratory practice in the Russian Federation» (Order of the Ministry of health of the Russian Federation № 708n from 23.08.2010) and guidelines with the «Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one» (2012). Experiments on animals were performed in accordance with the rules adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS123). Strasbourg, 1986). The studies were carried out in accordance with the approved written Protocol and in accordance with the standard operating procedures of the researcher (SOP).

The design and organization of the study are aimed at solving the goal and are based on the General principles of the organization of research on biological research on laboratory animals. The newly arrived animals were quarantined for 7 days in cages in a separate room. During the quarantine period were monitored the clinical indicators of animals health status. Animals were maintained in the vivarium according to the sanitary rules and standard diet in accordance with the Order of MH of the USSR № 1045–73 from 06.04.1973, good laboratory practice and the order of the Russian Ministry of health No. 1179 from 10.10.1983 in polycarbonate cages with 6 animals in each. Wood sawdust were used as a litter. Rats contained separately (in separate rooms). For feeding used dry briquetted fodder PK-120 GOST R51849–2011 R. 5 (Laboratorkorm, JSC, Moscow). For drinking was used tap water, which was given by *ad libitum* from standard drinkers. The temperature (20–22 °C) and humidity (60–70 %) of the air were monitored in each room daily and the indications were documented. The rooms were supported by natural and artificial lighting (12 hours of light/12 hours of darkness). Selection of animals in groups was carried out randomly by «random numbers», using body weight as a criterion. Individual values of body weight did not deviate from the average value in the group by more than 10 %. Animals were weighed on the scales

PA2102C (OHAUS). The mass of the animals specified in the period of drug introduction. Each animal had a distinct mark (picric acid solution); the label on the cell indicates the name of the experiment, its duration, group number, number of animals, the person in charge. Within 70 days, the General condition and behavior of animals were monitored; the clinical condition of animals was recorded daily, behavior, feed and water intake were noted; the condition of the hair, mucous membranes and etc. were taken into account. Experimental and control animals were weighed before administration of the drug, as well as weekly until the end of the experiment. At the end of the experiment, all animals were taken blood samples in vacuum tubes for in vitro diagnostics «Improvacuter» (Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd, China). For hematological studies, 0.5 ml of blood was collected in tubes with EDTA anticoagulant, for biochemical tests — 1–2 ml in tubes using thrombin as a clot activator.

The morphological composition of blood was studied using HemaScreen Vet (Hospitex Diagnostics, Italy) Hematology analyzer. Biochemical parameters of blood serum (total protein, albumin, calcium, phosphorus, magnesium, potassium, glucose, cholesterol, amylase activity, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) were determined by biochemical analyzer BA-88A Mindray (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, China) using reagents of «Hospitex Diagnostics» (Italy) production. Hormonal status of the investigated animals was determined by ELISA with the use of diagnostic systems «C-ELISA» LLC «HEMA», automatic tablet photometer PLATE SCREEN, «Hospitex Diagnostics» (Italy).

Statistical processing of the obtained results on the dynamics of changes in hematological and biochemical parameters of blood serum and urine indices was carried out according to standard procedures, using the application Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp. USA) and statistical package data analysis StatPlus 2009 Professional 5.8.4 for Windows (StatSoft Inc., USA), using student's t-test to assess the validity of differences between samples for experimental and control experiments. Based on the results of calculation of the arithmetic mean and standard deviation for this sample, the standard error of the arithmetic mean and the boundary of its confidence interval were determined taking into account the student coefficient $t(n, p)$ at the significance level of 95 % ($p = 0.05$) and the number of measurements. The significance of differences between the mean values in experimental and control experiments was evaluated by p-value in the variant of two-sample unpaired t-test (two-sample unpaired t-test) with unequal variances. Differences were accepted as accurate when the following

inequality is satisfied $P \geq 0.05$. In addition, in these cases, the observance of inequality $t, t(n, p)$ at $n = (df + 1)$ (where df is the number of degrees of freedom), $p = 0.05$,

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{(s_1^2 + s_2^2)^{1/2}},$$

where x_1 и x_2 are arithmetic means, s_1 and s_2 are their standard errors for two samples of experimental data [9] was also monitored.

Results and discussion

The content of zinc, iodine and selenium in mutton is directly dependent on the content of these trace elements in the diet, and their more significant localization is recorded in the meat of sheep of the third experimental group (Table. 3).

Thus, it was found that the enrichment of diets, organic forms of selenium and iodine in the technology of growing small cattle is promising and relevant and allows you to get lamb with high nutritional and biological value (Fig. 1).

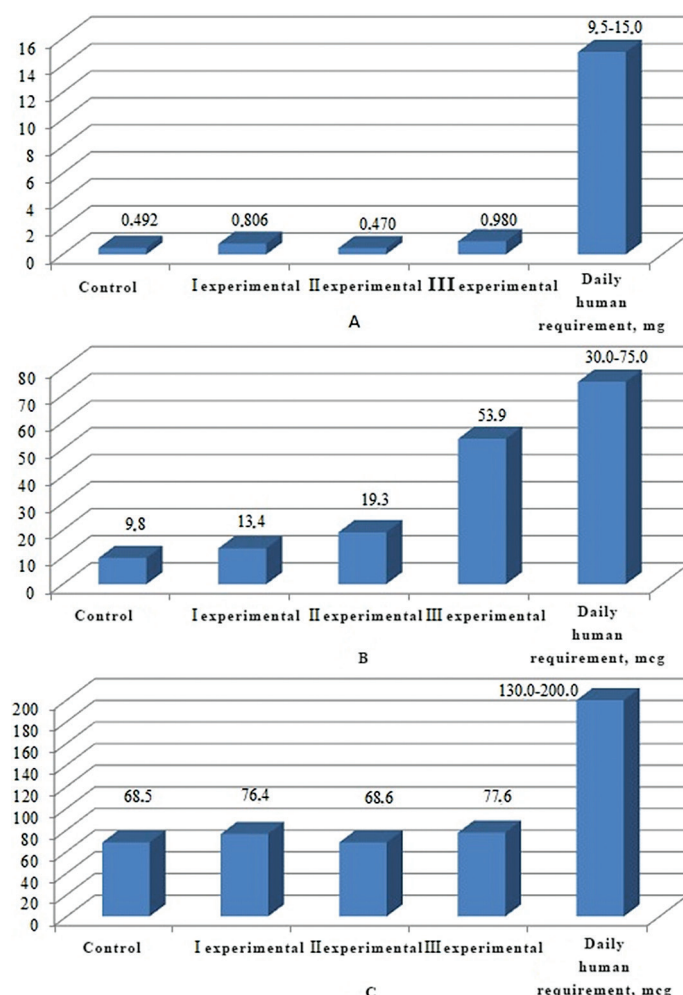


Figure 1. The content of 100 g of lamb depending on the diet: (A) zinc, (B) selenium, (C) iodine

Table 3. The content of trace elements in 100 g depending on the diet

Indicator	Control	I experimental	II experimental	III experimental	Set level of need in a day*
Zinc, mg	0.492 ± 0.11	0.806 ± 0.14	0.470 ± 0.10	0.980 ± 0.12	9.5–15.0
Selenium, mg	9.8 ± 0.23	13.4 ± 0.17	19.3 ± 0.19	53.9 ± 0.41	30.0–75.0
Iodine, mg	68.5 ± 0.26	76.40 ± 0.18	68.60 ± 0.23	77.60 ± 0.31	130.0–200.0

To study the dynamics of changes in the concentration of trace elements during of the processing in the production of lamb were developed snacks from *m. longissimus dorsi* rams of different groups.

It was found that the iodine content in *m. longissimus dorsi* of lamb of the I experimental group receiving additional «Ioddar-Zn» exceeded the content in the control group by 11.53 % ($P < 0.001$); zinc content — by 63.82 % ($P < 0.001$). Selenium content in *m. longissimus dorsi* of lamb of the II experimental group receiving in addition «DAFS-25» was higher, than in control by 96.94 % ($P < 0.001$). The content of selenium in the muscle *m. longissimus dorsi* of lamb of the III experimental group receiving jointly «Yoddar-Zn» and «DAFS-25», in 5.5 times ($P < 0.001$) exceeded its content in control, and the content of iodine and zinc — on 13.29 % ($P < 0.001$) and 99.19 % ($P < 0.001$). On the basis of more significant localization of trace elements in lamb III experimental group of raw materials of this group were made chips dry-cured «Volga» (TU9213-012-00493497-2012).

For the manufacture of dry-cured chips «Volga» the lamb (of the longest muscle of a back, part of the hip, eye muscle) freeze, cut on the slicer into thin slices, and salted wet method and dried in a climate chamber at 30 °C and relative humidity of 75–78% to purchase of the product necessary consumer properties. Packaging of chips was made on the vacuum line type Multivac R530 and Supervac, using packages type Cryovac TM-DLY9235. The technology allows you to store chips at a temperature of 12–15 °C for 6 months in a closed package.

Analysis of the results of the chemical composition of dry-cured chips enriched with trace elements, indicates their high nutritional value (Table. 4).

Table 4. Physico-chemical characteristics of potato chips «Volga»

Name of the product	Name of the indicator			
	Mass fraction of protein, %	Mass fraction of fat, %	Mass fraction of moisture, %	Mass fraction of table salt, %
chips «Volga»	48.5	11.0	38.7	1.8

The study of the changes dynamics in the concentration of trace elements in snacks showed that during processing the zinc content in the product decreased by 21.3 %, iodine — by 26.5 %, selenium — 16.3 % and amounted to 0.771 mg/kg, 57.01 mg/100g and 39.72 mg/100g, respectively ($P < 0.001$).

Due to the fact that dry — cured snacks are a product of long-term storage, the effect of shelf life on the loss of trace elements was studied. It was found that zinc losses in snacks, packed by vacuum during storage for 3 months decreased by 11.3 %, iodine-by 14.3 %, selenium-by 12.6 % of the original and amounted to 6.84 mg/kg; 34.72 mg/100g and 48.86 mg/100g, respectively (Table 5).

Thus, the content of zinc in dried snacks «Volzhsky» after 3 months of storage was 5.7; selenium-49.6 %;

iodine-32.6 % of the daily needs (Fig. 2) that in this case for iodine and selenium corresponds to the principles of enrichment: 15–50 % in the average daily portion (100g) of the physiological norm.

Table 5. Dynamics of trace elements content in 100 g products

Indicator	In raw meat	After processing	After storage for 3 months
Zinc, mcg	0.980 ± 0.12	0.771 ± 0.23	0.684 ± 0.15
Selenium, mcg	53.90 ± 0.41	39.72 ± 0.42	34.72 ± 0.17
Iodine, mcg	77.60 ± 0.31	57.01 ± 0.22	48.86 ± 0.21

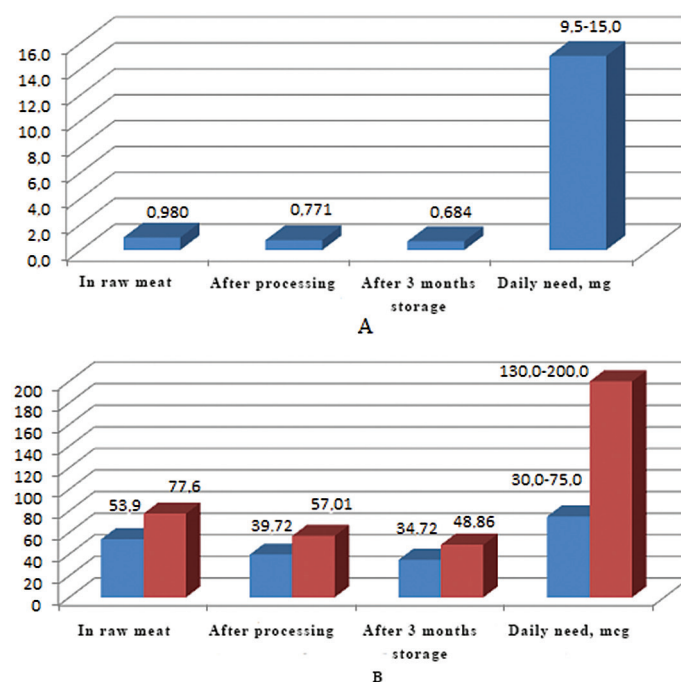


Figure 2. Dynamics of content (a) of zinc, (B) selenium and iodine in 100g of the finished product during storage

Thus, optimization of feeding of small cattle for zinc, iodine and selenium by enriching their diets with feed supplements «Yoddar-Zn» and «DAFS-25» had a positive impact not only on the quality of raw meat, but also contributed to the production of micronutrient enriched lamb for functional nutrition. The developed technology of dry-cured snacks enriched with organic forms of zinc, selenium and iodine will partially compensate for the deficit of these trace elements in the diet of the population. So, given that the average daily requirement of an adult in zinc-12 mg/day; in iodine-150 mg/day; in selenium-70 mg/day consumption of 100 g of snacks per day will contribute to the compensation of the daily requirement for zinc-by 5.7 %; iodine-by 32.6 %; selenium-by 49.6 %.

In the course of the experiment in vivo to study the physiological effects of the developed product in a living organism is established that in the groups of rats to which the composition of the diet was introduced foods fortified with selenium, and the selenium in combination with iodine, the total number of leukocytes was significantly higher compared to control group (Table 6). These changes correlate directly with the number of lymphocytes

Table 6. General blood test of laboratory animals (n=6)

Point no.	Indicator	Measure	I experimental	II experimental	III experimental	Control
1	WBC	x109/L	7.97 ± 2.67	11.78 ± 1.38*	13.47 ± 0.80*	7.12 ± 0.73
2	LYM	x109/L	4.70 ± 1.96	7.92 ± 0.98*	8.60 ± 0.59*	3.72 ± 0.41
3	MID	x109/L	1.73 ± 0.48	2.08 ± 0.20*	2.42 ± 0.25*	1.28 ± 0.12
4	GRA	x109/L	1.53 ± 0.24	1.78 ± 0.24	2.45 ± 0.17	2.12 ± 0.34
5	LYM	%	55.00 ± 5.89	66.70 ± 1.01*	63.63 ± 1.85*	52.46 ± 2.81
6	MID	%	22.40 ± 2.05*	17.90 ± 0.82	17.83 ± 1.24	17.88 ± 0.76
7	GRA	%	22.60 ± 4.02	15.40 ± 0.90*	18.53 ± 1.23*	29.66 ± 2.95
8	RBC	x109/L	8.07 ± 0.41	7.51 ± 0.25	7.11 ± 0.29	7.18 ± 0.26
9	HGB	g/L	121.33 ± 6.98*	115.83 ± 3.15*	107.50 ± 3.31	101.20 ± 4.21
10	MCHC	g/L	295.67 ± 6.89	305.33 ± 2.94	307.50 ± 3.51	298.40 ± 2.77
11	MCH	Pg	15.03 ± 0.12	15.45 ± 0.20*	15.17 ± 0.33*	14.10 ± 0.29
12	MCV	fl	50.80 ± 1.01*	50.60 ± 1.10*	49.30 ± 0.63	47.22 ± 0.65
13	RDW-CV	%	14.53 ± 0.75	14.47 ± 0.45	14.20 ± 0.13	13.96 ± 0.21
14	RDW-SD	fl	37.00 ± 2.71	36.60 ± 1.30*	35.00 ± 0.55*	32.94 ± 0.60
15	HCT	%	41.00 ± 1.53*	37.95 ± 1.03*	35.00 ± 1.20	33.90 ± 1.18
16	PLT	x109/L	615.33 ± 90.29	620.17 ± 87.68	587.50 ± 30.20	519.20 ± 80.24
17	MPV	fl	6.43 ± 0.17	6.15 ± 0.13	5.92 ± 0.14	6.22 ± 0.16
18	PDW	fl	4.50 ± 0.55	5.07 ± 0.26	4.57 ± 0.20	4.84 ± 0.12
19	PCT	%	0.40 ± 0.20	0.38 ± 0.06	0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.07
20	P-LCR	%	8.10 ± 1.01	7.10 ± 1.04	5.83 ± 1.41	7.02 ± 0.86

*P ≤ 0.05 relative to control

and medium cells in peripheral blood, which indicates an increase in resistance in animals. Along with this, significantly higher hemoglobin concentrations and, as a consequence, higher rates of average hemoglobin content in erythrocytes, as well as the average volume of red blood cells in animals of these groups compared with the control were revealed. This fact indicates the stimulating effect of selenium and iodine on the hematopoietic function of the bone marrow in the body of experimental animals.

In addition, biochemical blood tests revealed significantly higher transaminase activity (Alt and AST) in the experimental groups of animals compared to the control (Table 7).

These changes are directly proportional to the total protein, glucose and amylase activity in the blood serum. This

indicates an increase in the conversion of feed nutrients in experimental animals, as evidenced by the increase in serum protein in animals, which were introduced into the diet products enriched with essential trace elements. Increased conversion of feed nutrients has led to an increase in amino acids, which are a substrate for transamination, which leads to the activation of transaminases within the physiological boundaries of the norm. Aminotransferase is cleaved from the amino group of amino acids and transfer them to acceptor molecules with the subsequent formation of irreplaceable and replaceable amino acids used as energy source. The increase in energy metabolism in the body of experimental groups of animals can be judged by the activity of amylase and serum glucose concentration, which in these animals also increase relative to control. However,

Table 7. Biochemical blood analysis of laboratory animals (n=6)

Point no.	Indicator	Measure	I experimental	II experimental	III experimental	Control
1	AsT	U/l	101.10 ± 12.29	146.85 ± 9.91*	124.20 ± 22.49	84.10 ± 12.94
2	ALT	U/l	118.20 ± 4.43*	123.72 ± 4.97*	120.40 ± 16.95*	80.10 ± 8.37
3	Common protein	g/l	143.30 ± 29.73	132.67 ± 13.50*	106.10 ± 13.41	89.23 ± 12.67
4	Glucose	mmol/l	12.20 ± 2.35*	8.79 ± 0.40*	8.40 ± 1.12*	3.52 ± 0.45
5	Amylase	U/l	547.80 ± 32.72*	529.00 ± 18.68*	558.40 ± 59.83*	394.54 ± 39.03
6	Calcium	mmol/l	2.40 ± 0.10	2.61 ± 0.22	2.7 ± 0.15	2.79 ± 0.31
7	Phosphorus	mmol/l	2.00 ± 0.32	1.72 ± 0.18	1.60 ± 0.18	2.19 ± 0.24
8	Magnesium	mmol/l	1.30 ± 0.17	1.25 ± 0.06	1.30 ± 0.19	1.35 ± 0.06
9	Cholesterol	mmol/l	2.30 ± 0.06	2.24 ± 0.06*	2.50 ± 0.19*	3.82 ± 0.52
10	Potassium	mmol/l	5.40 ± 0.60*	4.64 ± 0.57	5.40 ± 0.53*	3.92 ± 0.29
11	Albumin	g/l	9.2 ± 4.84*	19.35 ± 8.94	20.50 ± 7.41	26.9 ± 3.59
12	Lipase	U/l	23.1 ± 2.72	21.50 ± 1.19	34.10 ± 7.62	22.68 ± 2.35

*P ≤ 0.05 relative to control

Note: AsT — aspartate aminotransferase

ALT — alanine aminotransferase

Table 8. Hormonal screening of laboratory animals (n=6)

Point no.	Indicator	Measure	I experimental	II experimental	III experimental	Control
1	Thyroid stimulating hormone	uIU/ml	3.00 ± 0.67	2.85 ± 0.51*	2.55 ± 0.56	2.52 ± 0.29
2	Triiodothyronine	nmol/l	1.43 ± 0.20*	1.55 ± 0.41	2.23 ± 0.56*	3.92 ± 0.50
3	Comon thyroxine	nmol/l	34.13 ± 7.16*	40.32 ± 5.12*	47.98 ± 5.48*	67.84 ± 5.93

*P ≤ 0.05 relative to control

these indicators do not exceed the reference values for this animal species.

During the study of the functional activity of the thyroid gland, it was found that in animals of the experimental groups the concentration of thyroid stimulating hormone in the blood serum was significantly higher than in rats from the control group (Table 7).

Given the fact that thyrotropin regulates the function of the thyroid gland, this change can be regarded as a positive effect of products enriched with essential trace elements on the functional activity of the thyroid gland and as a consequence on the metabolic processes in animals. This fact is confirmed by the dynamics of live weight gain in experimental and control rats (Fig. 3).

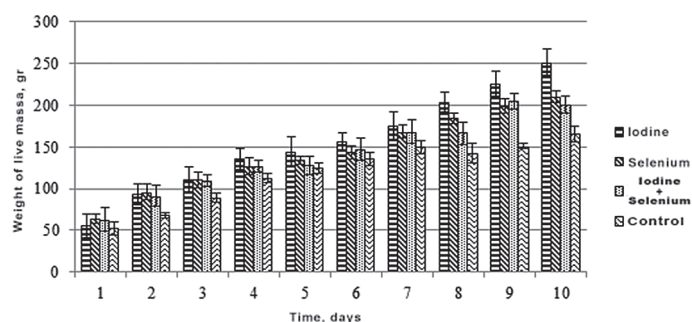


Figure 3. Dynamics of live weight of experimental rats, g

So in the course of the experiment it was found that the dynamics of live weight gain in rats, the diet of which included snacks from mutton, enriched with both iodine and selenium, and iodine and selenium together, was significantly higher than in the control group of animals.

Conclusion

Thus, optimization of diets of small cattle for zinc, iodine and selenium by enriching diets with feed supplements «Yoddar-Zn» and «DAFS-25» had a positive impact not only on the productivity of animals, but also contributed to the production of lamb for further production of functional meat products. The technology of dry-cured snacks from mutton enriched with organic forms of zinc, selenium and iodine is developed. The positive effect of the developed snacks from lamb enriched with iodine, selenium and zinc on metabolic processes in the body of experimental animals is experimentally proved, which confirms the feasibility of their use in the correction of protein, carbohydrate, fat and mineral metabolism. These trace elements, which are part of this product, have high bioavailability, which contributes to the normalization of physiological functions of the body in alimentary insufficiency. The creation of domestic meat products enriched with trace elements is important to provide the population with dietary products with high organoleptic and functional properties. Their production is of great medical and social importance for the prevention of micronutrient deficiencies in the body, improve immunity, normalization of metabolism and endocrine system. The products are recommended for correction of protein, carbohydrate, fat and mineral metabolism.

Acknowledgment

The work was supported by the Russian Science Foundation (The scientific project № 15-16-10000).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Проект «Основы государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года». [Электронный ресурс: <https://rg.ru/2010/11/03/pravila-dok.html> Дата обращения 11.07.2018 г.]
2. Калашников, А.П., Фисинин, В.И., Щеглов, В.В., Клейменов, Н.И. (2003). Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочник. 3-е издание переработанное и дополненное. М, Россельхозакадемия. — 456 с.
3. Горлов, И.Ф. (2009). Разработка и широкая реализация современных технологий производства, переработки и создания отечественной конкурентоспособности продукции животноводства. Волгоград, Волгоградское научное издательство. — 121 с.
4. Горлов, И.Ф. (2005). Новое в производстве пищевых продуктов повышенной биологической ценности. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 3, 57–58.
5. Belik, S.N., Gorlov, I.F., Slozhenkina, M.I., Zlobina, E.Y., Pavlenko, A.S. (2015). Morpho-functional state of the liver of the rats

- fed the rations with meat of the pigs grown with antimicrobials. *Pakistan Veterinary Journal*, 35(3), 325–328.
6. Горлов, И.Ф. (2010). Создание системных технологий производства продукции животноводства. *Вестник мясного скотоводства*, 1(63), 9–15.
7. Гиро, Т.М., Горлов, И.Ф., Шарова, М.В., Ранделин, Д.А. (2012). Инновационные подходы к обогащению мясного сырья органическим йодом. *Fleischwirtschaft Russia*, 1, 66–68.
8. Gorlov, I.F., Mosolova, N.I., Zlobina, E.Yu., Korotkova, A.A., Prom, N.A. (2014). Use of new supplement feeds based on organic iodine in rations of lactating cows. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 14(5), 401–406.
9. Johnson, R.A., Bhattacharyya, G.K. (2010). *Statistics. Principles and methods*, 6th ed. USA: John Wiley & Sons, Inc. — 706. ISBN-13 978-0-470-40927-5

REFERENCES

1. Fundamentals of state policy of the Russian Federation on the healthy nutrition of the population for the period till 2020. [Electronic resource: <https://rg.ru/2010/11/03/pravila-dok.html> Access date 11.07.2018] (in Russian)
2. Kalashnikov, A.P., Fisinin, V.I., Shcheglov, V.V., Kleimenov, N.I. (2003). Standards and feeding rations of farm animals. Reference manual. 3rd edition, revised and enlarged. M: Rossel'hoz'akademiya. — 456 p. (in Russian)
3. Gorlov, I.F. (2009). Development and broad implementation of modern production technologies, processing, and creation of domestic livestock production competitiveness: monograph. Volgograd: Volgogradskoe nauchnoe izdatel'stvo. — 120 p. (in Russian)
4. Gorlov, I.F. (2005). New research in production of food with increased bioavailability. *Storage and processing of farm materials*, 3, 57–58. (in Russian)
5. Belik, S.N., Gorlov, I.F., Slozhenkina, M.I., Zlobina, E.Y., Pavlenko, A.S. (2015). Morpho-functional state of the liver of the rats fed the rations with meat of the pigs grown with antimicrobials. *Pakistan Veterinary Journal*, 35(3), 325–328.
6. Gorlov, I.F. (2010). The formation of system technologies in animal husbandry production. *Herald of beef cattle breeding*, 1(63), 9–15. (in Russian)
7. Giro, T.M., Gorlov, I.F., Sharova, M.V., Randelin, D.A. (2012). Innovative approaches to the enrichment of raw meat with organic iodine. *Fleischwirtschaft Russia*, 1, 66–68. (in Russian)
8. Gorlov, I.F., Mosolova, N.I., Zlobina, E.Yu., Korotkova, A.A., Prom, N.A. (2014). Use of new supplement feeds based on organic iodine in rations of lactating cows. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 14(5), 401–406.
9. Johnson, R.A., Bhattacharyya, G.K. (2010). *Statistics. Principles and methods*, 6th ed. USA: John Wiley & Sons, Inc. — 706. ISBN-13 978-0-470-40927-5

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ:

WBC (white blood cells — белые кровяные тельца) — лейкоциты в абсолютных числах
 RBC (red blood cells — красные кровяные тельца) — эритроциты в абсолютных числах
 HGB (Hb, hemoglobin) — гемоглобин, концентрация в цельной крови
 HCT (hematocrit) — гематокрит
 PLT (platelets — кровяные пластинки) — тромбоциты в абсолютных числах
 MCV —средний объем эритроцита
 MCH — среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците
 MCHC — средняя концентрация гемоглобина в эритроците
 MPV (mean platelet volume) — средний объем тромбоцитов
 PDW — относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму

PCT (platelet crit) — тромбоцит
 LYM% (LY%) (lymphocyte) — относительное содержание лимфоцитов.
 LYM# (LY#) (lymphocyte) — абсолютное содержание лимфоцитов.
 MID% — относительное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов.
 MID# — абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов.
 GRA% — относительное (%) содержание гранулоцитов.
 GRA# — абсолютное содержание гранулоцитов.
 RDW-SD — относительная ширина распределения эритроцитов по объёму.
 RDW-CV — относительная ширина распределения эритроцитов по объёму.
 P-LCR — коэффициент больших тромбоцитов.

DESIGNATIONS AND ABBREVIATIONS:

WBC (white blood cells) — leukocytes in absolute numbers
 RBC (red blood cells) — erythrocytes in absolute numbers
 HGB (Hb, hemoglobin) — hemoglobin concentration in whole blood
 HCT — hematocrit
 PLT (platelets) — platelets in absolute numbers
 MCV — mean erythrocyte volume
 MCH — mean amount of hemoglobin in individual erythrocyte
 MCHC — mean concentration of hemoglobin in erythrocyte
 MPV — mean platelet volume
 PDW — relative width of the platelets volume distribution
 PCT — platelet crit

LYM% (LY%) (lymphocyte) — relative content of lymphocytes
 LYM# (LY#) (lymphocyte) — absolute content of lymphocytes
 MID% — relative content of the mixture of monocytes, basophils and eosinophils
 MID# — absolute content of the mixture of monocytes, basophils and eosinophils
 GRA% — relative (%) content of granulocytes
 GRA# — absolute content of granulocytes
 RDW-SD — relative width of the erythrocyte volume distribution
 RDW-CV — relative width of the erythrocyte volume distribution
 P-LCR — ratio of large platelets

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Гиро Татьяна Михайловна — доктор технических наук, профессор кафедры «Технология производства и переработки продукции животноводства», Саратовский Государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335

Тел.: +7-960-342-30-16

E-mail: girotm@sgau.ru

*автор для переписки

Горлов Иван Федорович — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАН, Научный руководитель, Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции

400131, г. Волгоград, ул. Рокоссовского, 6

Тел.: +7-8442-39-10-48

E-mail: niimmp@mail.ru

Сложенкина Марина Ивановна — доктор биологических наук, профессор, директор, Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции

400131, г. Волгоград, ул. Рокоссовского, 6

Тел.: +7-8442-39-10-48

E-mail: niimmp@mail.ru

Козлов Сергей Васильевич — кандидат ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза», Саратовский Государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335

Тел.: +7-917-214-19-38

E-mail: Kozlovsv12@yandex.ru

Тасмуханов Ногман Васильевич — аспирант, кафедра «Технология производства и переработки продукции животноводства», Саратовский Государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335

Тел.: +7-927-057-90-00

E-mail: tnogman@mail.ru

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 23.07.2018

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Tatiana M. Giro — doctor of technical sciences, professor of the department «Technology of production and processing of livestock products», Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov

410005, Saratov, Sokolovaya str., 335

Tel.: +7-960-342-30-16

E-mail: girotm@sgau.ru

*corresponding author

Ivan F. Gorlov — doctor of agricultural sciences, professor, academician of RAS, Scientific supervisor, Povolzhskiy Research Institute of Production and Processing of Meat and Dairy Products

400131, Volgograd, Rokossovskogo str., 6

Tel.: +7-8442-39-10-48

E-mail: niimmp@mail.ru

Marina I. Slozhenkina — doctor of biological sciences, professor, Director, Povolzhskiy Research Institute of Production and Processing of Meat and Dairy Products

400131, Volgograd, Rokossovskogo str., 6

Tel.: +7-8442-39-10-48

E-mail: niimmp@mail.ru

Sergey V. Kozlov — candidate of veterinary sciences, docent, docent of the department Diseases of animals and veterinary and sanitary examination, Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov

410005, Saratov, Sokolovaya str., 335

Tel.: +7-917-214-19-38

E-mail: Kozlovsv12@yandex.ru

Nogman V. Tasmuchanov — graduate student of the department «Technology of production and processing of livestock products», Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov

410005, Saratov, Sokolovaya str., 335

Tel.: +7-927-057-90-00

E-mail: tnogman@mail.ru

Contribution

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

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 23.07.2018

МНОГОКРИТЕРИАЛЬНАЯ ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЦЕПТУРНОГО СОСТАВА ПРОДУКТА

Никитина М.А.*, Чернуха И.М.

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

Ключевые слова: Парето-оптимальное множество, множество недоминируемых альтернатив, многокритериальная оптимизация

Аннотация

Научное направление моделирования многокомпонентных пищевых продуктов с определенным набором показателей пищевой и энергетической ценности до сих пор актуально во всем мире. В настоящее время хорошо изучены математические основы решения задач по одному критерию (однокритериальная оптимизация). Однако в различных областях инженерных решений, научно-исследовательской и управленческой деятельности встречаются многокритериальные задачи, в которых систему необходимо оптимизировать по нескольким критериям одновременно. Цель работы теоретическое обоснование методологии многокритериальной модели оптимизации рецептурного состава пищевого продукта в различных постановках для различных критериев пищевой, биологической, энергетической ценности, а также аминокислотного, жирнокислотного, витаминного и минерального соответствия. Предлагается использовать эффективный метод многокритериальной оптимизации — метод Парето. В связи с тем, что Парето-оптимальное решение может быть не единственным дано определение Парето-оптимального множества решений, как множества недоминируемых альтернатив. Авторами предлагается не выделять недоминирующие варианты продуктов питания, а несколько расширить подмножество путем выделения в исходном множестве ядра, все альтернативы которого несравнимы между собой, и любой вариант, невошедший в ядро, доминируется хотя бы одной альтернативой ядра. Дальнейшее усечение вариантов может быть достигнуто заданием других более жестких ограничений, например, увеличением порогового значения индекса согласия S и уменьшением порога индекса несогласия. Использование *it*-технологий, реализуемых методами многокритериальной структурной оптимизации и математического программирования, которые позволяют скорректировать и оптимизировать рецептуры пищевых продуктов по различным критериям нелинейного характера, структурировать полученное множество альтернатив и определить оптимальный вариант рецептуры пищевого продукта заданного качества, состава и свойств или рациона питания для определенной категории людей с учетом лечебно-профилактической направленности.

Original scientific paper

MULTI-CRITERIA OPTIMIZATION OF A PRODUCT RECIPE COMPOSITION

Marina A. Nikitina*, Irina M. Chernukha

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

Key words: Pareto-optimal set, set of non-dominated alternatives, multi-criteria optimization

Abstract

The scientific direction of multicomponent food modeling with a certain set of indicators for nutritional and energy values is still topical in the whole world. At present, the mathematical foundations of solving tasks by a single criterion (single-criterion optimization) are well studied. However, multi-criteria tasks, in which a system is to be optimized by several criteria simultaneously, exist in various fields of engineer solutions, research and management activities. The aim of the work is to theoretically substantiate the methodology of the multi-criteria model of food recipe optimization in different settings for different criteria of nutritional, biological and energy values, as well as amino acid, fatty acid, vitamin and mineral adequacy. It is proposed to use an effective method of multi-criteria optimization — the Pareto method. Since the Pareto-optimal solution can be not the only one, the definition of the Pareto-optimal set of solutions is given as a set of non-dominated alternatives. The authors propose not to select non-dominative options of food products, but slightly extend a subset by choosing a nucleus in the initial set, in which all alternatives are incomparable to each other and any option that is not included in the nucleus is dominated by at least one alternative of the nucleus. The following reduction of the options can be achieved by imposing other tighter constraints, for example, by increasing the threshold value for the index of agreement C and decreasing the threshold value for the index of disagreement. The use of the IT-technologies realized by the methods of multi-criteria structure optimization and mathematical programming allows correcting and optimizing food recipes by different criteria of the non-linear character, structuring the obtained set of alternatives and detecting the optimal food recipe option with the targeted quality, composition and properties or a diet for a particular population category with consideration for the therapeutic and prophylactic direction.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Никитина М.А., Чернуха И.М. Многокритериальная оптимизация рецептурного состава продукта. Теория и практика переработки мяса. 2018; 3(3): 89–98. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-89-98

FOR CITATION: Nikitina M. A., Chernukha I. M. Multi-criteria optimization of a product recipe composition. Theory and practice of meat processing. 2018; 3(3): 89–98. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-89-98

Введение

Среди множества факторов внешней среды, оказывающих воздействие на организм человека, питание является одним из наиважнейших. Нарушения гомеостаза наиболее часто проявляются симптомокомплексами недостаточности белковой, белково-энергетической, витаминной и минеральной природы, что приводит к ослаблению иммунобиологической резистентности организма, в результате чего могут возникнуть инфекционные заболевания, снижение эффективной медикаментозной терапии.

Приоритетными задачами государственной политики Российской Федерации в области здорового питания являются увеличение производства и расширение ассортимента пищевых продуктов, обогащенных функциональными ингредиентами, специализированных продуктов питания, продуктов функционального назначения, в том числе для питания в организованных коллективах, и биологически активных добавок к пище [1].

Новые умные технологии для производства специализированных продуктов, ориентированные на персонализацию питания, базирующиеся на внедрении цифровых технологий, позволят расширить ассортимент пищевых продуктов, что будет способствовать предупреждению развития многих неинфекционных заболеваний.

В настоящее время для проектирования рецептур многокомпонентных пищевых продуктов в основном используются методы линейного, экспериментально-статистического программирования и объектно-ориентированного подхода.

Процесс оптимизации состава рецептур основан на использовании расчетных критериев и понятий, предложенных Роговым И.А., Липатовым Н.Н. (мл.), Лисицыным А.Б., Титовым Е.И., а также методах системного анализа, моделирования и ассортиментно-рецептурной оптимизации, рассмотренных в работах Кафарова В.В., Гордеева Л.С., Протопопова И.И., Ивашкина Ю.А. и др.

Анализ научно-технической и патентной информации о современных тенденциях и перспективах совершенствования качества продуктов за счет проектирования нутриентной и технологической адекватности многокомпонентных пищевых смесей (сред) свидетельствует о том, что эти вопросы не остаются без внимания ведущих ученых и в наше время.

Липатовым Н.Н. (мл.) [2,3] проводились исследования по вопросам проектирования продуктов и рационов питания с задаваемой пищевой ценностью с применением ЭВМ. Начальная стадия разработки теоретических основ и конкретных методов реализации принципов проектирования сбалансированных пищевых продуктов была связана с формализацией качественных и количественных представлений о рациональности использования незаменимых аминокислот.

Формализация учитывает взаимосбалансированность незаменимых аминокислот. На основании принципа Митчелла–Блока им предложены коэффициенты различия аминокислотного состава, утилитарности аминокислотного состава и показатель сопоставимой избыточности. Несмотря на теоретическую обоснованность, экспериментальная проверка взаимосбалансированности аминокислот включает в себя исследования метаболизма в организме человека, что является очень сложным [3].

Для нахождения частного критерия Липатовым Н.Н. (мл.) использовалась функция желательности Харрингтона. Преимущество функции желательности Харрингтона заключается в её безразмерности, что позволяет производить моделирование с использованием факторов различной размерности и диапазона значений варьируемых переменных. Этому подходу свойственен недостаток, который заключается в объединении многих факторов в один комплексный критерий, что значительно уменьшает степень корректности модели.

При разработке молочных продуктов [4] повышенной биологической ценности применялся метод экспериментально-статистического моделирования, основанный на выделении ключевого нутриента моделирования и оптимизации его качества.

В работе [5] предложена трех этапная методика проектирования рецептур геродиетических мясных продуктов. Первый этап связан с моделированием аминокислотного состава и выбором значений, в наибольшей степени удовлетворяющих критерию; второй — оценкой жирнокислотного состава; третий — расчетом энергетической ценности. Процесс моделирования осуществлялся авторами в общем виде циклическим алгоритмом, предложенным Липатовым Н.Н. (мл.) [2].

Муратовой Е.И. и др. [6] применяется модифицированный метод иерархий (или метод Саати) и объектно-ориентированный подход решения. Особенность данного метода — представление рецептуры в виде иерархической структуры. Каждая из вершин данной структуры — объект (сырье — полуфабрикат — готовый продукт). Каждый уровень — определенная стадия технологии изготовления пищевого продукта, в результате может иметь индивидуальное число вершин, расположенных ниже по иерархии. Алгоритм расчета многокомпонентного продукта начинается с расчета последнего уровня с наиболее длинной ветви иерархической структуры расчета.

Борисенко А.А. [7] на базе математических моделей и рекурсивного цикла обеспечивает получение необходимого набора вариантов и состава поликомпонентных смесей по критерию макро- и микронутриентного состава.

Бессоновой Л.И. [8] разработана структурированная функция качества для пищевых продуктов, основанная на определении автокорреляционной функции,

позволяющий построить прогнозную модель управления перспективными показателями технологических процессов, готовых пищевых продуктов и услуг.

Саниной Т.В. и Сербуловым Ю.С. (2004) предложена концепция дифференцированного подхода в комплексной оценке качества хлебобулочных изделий повышенной пищевой ценности. Авторы считают, что для объективной оценки повышения пищевой ценности приоритет в выборе определяющих показателей качества должен быть на стороне потребителей и оценка качества должна включать показатели продукции, которые удовлетворяют определенным потребностям в соответствии с ее назначением [9].

Запорожский А.А. с соавторами (2012) используя методологический подход к конструированию новых геродиетических продуктов с применением принципов современной нутрициологии, квалиметрии и теоретических постулатов пищевой комбинаторики нейросетевой аппроксимации теоретических (расчетных) и экспериментальных данных обосновал рецептуры новых продуктов геродиетического назначения с заданными качественными характеристиками на основе природного сырья [10].

Резниченко И.Ю. и др. (2012) научно обоснован комплексный товароведно-технологический подход к разработке функциональных пищевых продуктов, обогащенных биологически активными веществами и пищевыми волокнами. В процессе исследования изучались факторы, формирующие качество специализированных изделий, определение критических контрольных точек в процессе производства и на этапе товародвижения с целью идентификации функциональной направленности продукта, разработку номенклатуры потребительских свойств, включающей, кроме органолептических, физико-химических показателей, показатели функциональной направленности и разработку алгоритма экспертизы функциональных завтраков сухих мюсли-батончика [11].

Киселев В.М. и Першина Е.Г. (2009) рассматривала производство и потребление функциональных продуктов как состояние многофакторной системы на основе методологии пищевой комбинаторики, паритета потребностей и *vital*-концепции с учетом современных требований науки о питании и их комплексной товароведной оценки. При данном подходе была изучена возможность эволюционного развития процесса проектирования функциональных продуктов питания на основе методологии пищевой комбинаторики, определены покупательские предпочтения функциональных продуктов питания и произведена их систематизация в виде модели потребительской ценности [12].

Большая роль в решении комплекса проблем, связанных с совершенствованием качества и технологий специализированных многокомпонентных продуктов питания, принадлежит информационным аспектам моделирования и оценки нутриентной адекватности

сырья и готовой продукции, являющихся объектами пищевых технологий.

К настоящему моменту разработаны и активно используются различные программные продукты для автоматизации технологических расчетов рецептур пищевых продуктов различных групп и рационов питания: Etalon [13], ШкоОптиПит [14], «Разработка рецептур композиций из растительного сырья» [15], Generic 2.0 [16], «Система расчетов для общественного питания» [17], CheesePro 1.0 [18], продукт «Виген-Софт: Питание в детском саду» [19], «АБЕРС: Расчет меню питания» [20], Шеф Эксперт [21] и т.д.

Все перечисленные программы осуществляют оптимизацию продукта, рациона на основании одного критерия (как правило критерия энергетической или пищевой ценности), остальные показатели (содержание конкретного макро — микронутриента, соотношение между ними) учитываются в качестве ограничений.

Однако множество реальных проблем в различных сферах исследовательской и управленческой деятельности связано с многофакторным анализом сложных систем и появлением класса многокритериальных задач принятия решений.

Цель статьи показать методологию многокритериальной модели оптимизации рецептурного состава пищевого продукта в различных постановках для различных критериев пищевой, биологической и энергетической ценности, аминокислотного, жирнокислотного, витаминного и минерального соответствия.

Объекты и методы

Большинство методов многокритериальной оптимизации принятия решений основывается на представлении о существовании так называемого лица, принимающего решения (ЛПР). Основным таким лицом является человек. Его интересы субъективны и служат основой соизмерения различных частных критериев. Существуют различные способы вовлечения человека в процесс принятия решений, на основе которых строятся различные многокритериальной методы принятия решений. Эти методы условно разбивают на три большие группы:

1 группа. Методы, основанные на выявлении предпочтений ЛПР и построения единственного критерия качества решения до рассмотрения конкретных альтернатив;

2 группа. Методы диалоговые итерационные человеко-машинные, состоящие в последовательном анализе возможных решений с постепенным выявлением предпочтений ЛПР и переходом к более предпочтительному решению;

3 группа. Методы, основанные на предварительном выделении множества оптимизированных (эффективных) решений и на представлении этого множества ЛПР [22,23].

Одним из наиболее эффективных методов многокритериальной оптимизации, когда число параметров, по которым производится оценка относительно невелико, является метод Парето [24,25,26,27], относящийся к 3 группе методов. Так как Парето-оптимальное решение может быть не единственным, то возникает понятие Парето-оптимального множества решений как множества недоминируемых альтернатив.

Метод Парето для решения задачи. Метод для демонстрации состояния системы, при котором значение каждого частного показателя, характеризующего систему, не может быть улучшено без ухудшения других. Согласно Парето: «Всякое изменение, которое никому не приносит убытков, а некоторым людям приносит пользу (по их собственной оценке), является улучшением» [28]. Значит, признаётся право на все изменения, которые не приносят никому дополнительного вреда.

Понятие Парето-оптимального множества. Определение: альтернатива A называется *доминирующей* по отношению к альтернативе B , если по всем критериям оценки альтернативы A не хуже, чем альтернативы B , а хотя бы по одному критерию оценка A лучше. Альтернатива B при этом называется *доминируемой*.

$$(y_i, y_j) \in R_p \rightarrow \forall_k: [f_k(y_i) \geq f_k(y_j)] \Delta [f(y_i) \neq f(y_j)], \begin{cases} f_1(x) \rightarrow \max \\ f_2(x) \rightarrow \max \end{cases}$$

Если для некоторой точки $y^0 \in Y$ не существует более предпочтительной по Парето точки, т.е. такой точки y , что $(y, y^0) \in R_p$, то тогда точка y^0 называется эффективным или Парето-оптимальным решением многокритериальной задачи (относится к множеству Парето).

Построения множества Парето. Приближенное построение множества Парето относится к числу очень важных и трудных задач численного анализа. С расширением круга проблем, значение методов эффективного анализа множества Парето непрерывно возрастает.

Аксиомы, являющиеся основой принципа Парето:

- аксиома исключения доминирующих решений: Для всякой пары допустимых решений, для которых имеет место соотношение, выполнено;
- аксиома Парето: Для всех пар допустимых решений, для которых имеет место неравенство, выполняется соотношение;
- принцип Парето: наилучшее решение многокритериальной задачи всегда выбирается из Парето-оптимального множества.

Если для пары рецептов (продуктов) нельзя установить предпочтение, то такие рационы называют несравнимыми. Решение является оптимальным по Парето, если не существует другого решения, улучшающего значение одного из критериев без ухудшения

при этом других критериев. Так как Парето-оптимальное решение может быть не единственным, то возникает понятие Парето-оптимального множества решений как множества недоминируемых альтернатив.

Результаты и обсуждение

В задачах структурной оптимизации состава многокомпонентных продуктов направленного действия (специализированного назначения) множество критериев выбора оптимального варианта включает критерии минимального отклонения от эталонных структур:

- аминокислотного состава продукта;
 - жирнокислотного состава;
 - содержание витаминов;
 - состава микроэлементов,
- а также критерии переваримости пищи, пищевой, биологической и энергетической ценности [29].

Исходное множество критериев $F_i; i = \overline{1, n}$ является открытым и может дополняться другими показателями и оценками качества продуктов, например усвояемости пищи. Каждый рецептурный вариант (альтернатива) Парето-оптимального множества решений для заданного набора исходных компонент рецептуры соответствует экстремальному значению одного из критериев $\text{extr}\{F_1, \dots, F_n\}$ при заданных ограничениях.

Общая постановка задачи многокритериального выбора оптимального продукта питания имеет следующий вид: $p = (p_1, p_2, \dots, p_n) \in P$ — множество альтернатив (рецептур продукта питания); $F_i(a_j) i = \overline{1, m}; j = \overline{1, n}$ — множество критериев оценки рецептов продуктов.

Если лучшей альтернативе (p_j) соответствует минимум критерия $F_i(p_j)$, то поиск оптимальной рецептуры продукта сводится к минимизации векторного критерия $F(P)$ на множестве альтернатив P :

$$F(P) = \{F_1(p_j), F_2(p_j), \dots, F_i(p_j), \dots, F_m(p_j)\} \rightarrow \min p \in P \quad (1)$$

В случае сравнения двух рецептов $p_i \in P$ и $p_j \in P$, при условии $F_i(p_i) \leq F_j(p_j)$ для всех $i, j = \overline{1, m}$, очевидно, что продукт p_i не хуже, чем продукт p_j и, если существует такое $i = \overline{1, m}$, что $F_i(p_i) < F_j(p_j)$, то продукт p_i лучше продукта p_j .

Пусть $WP(P)$ — множество несравнимых рецептов (продуктов), тогда для $p^* \in P$ и любого другого $p \in P$ всегда найдется такой критерий $F_i(p) i = \overline{1, m}$, для которого $F_i(p^*) < F_i(p)$, то можно утверждать, что рецептуры продуктов питания представляют собой Парето-оптимальное множество

$$WP(P) = \{p^* \mid \forall p \in P (\exists i = \overline{1, m} [F_i(p^*) < F_i(p)])\} \quad (2)$$

В связи с этим для заданного продукта получаем множество альтернативных решений, соответствующих экстремальным значениям отдельных критериев с невозможностью дальнейшего улучшения других критериев без ухудшения данного.

Для оценки и выбора лучшей альтернативы (продукта) необходимо структурировать альтернативы по критериям адекватности. Множество оцениваемых альтернатив заносится в «критериальную таблицу» (Табл. 1).

Таблица 1. Критериальная матрица альтернатив

	F_1	F_2	...	F_i	...	F_m
P_1	x_{11}	x_{12}	...	x_{1i}	...	x_{1m}
P_2	x_{21}	x_{22}	...	x_{2i}	...	x_{2m}
...	...	...	...	...	...	...
P_j	x_{j1}	x_{j2}	...	x_{ji}	...	x_{jm}
...	...	...	...	...	...	...
P_n	x_{n1}	x_{n2}	...	x_{ni}	...	x_{nm}

где x_{ij} — оценка i -ой альтернативы (продукта) p_i по критерию j -му критерию (F_j) $i=1, m; j=1, n$.

Для построения бинарного предпочтения экспертом в данной области каждому из критериев F_i назначается вес ω_i , характеризующий его важность.

Для сравнения альтернатив (продуктов) p_i и p_j полное множество критериев разбивается на три подмножества $\{I_+, I_-, I_0\}$:

$I_+(p_i, p_j)$ — критерии, по которым рецептуры продукта p_i превосходят рецептуры продукта p_j ;

$I_-(p_i, p_j)$ — критерии, по которым рецептуры продукта p_i и рецептуры p_j имеют эквивалентные оценки;

$I_0(p_i, p_j)$ — критерии, по которым рецептуры продукта p_j превосходят рецептуры продукта p_i .

Далее экспертным путем определяются относительная важность $\omega_{+ij}, \omega_{=ij}, \omega_{-ji}$ каждого из этих подмножеств. Кроме этого задается некоторый порог C и считается, что продукт p_i превосходит продукт p_j только в том случае, когда функция f_s (индекс согласия) удовлетворяет условию

$$f_s(\omega_{+j}, \omega_{=j}, \omega_{-j}) \geq C \quad (3)$$

Важность групп критериев $I_+(p_i, p_j), I_-(p_i, p_j), I_0(p_i, p_j)$ определяется как сумма весов, входящих в них критериев

$$\omega^* = \sum \omega_i \quad (4)$$

где $*$ ∈ {+, -, =}; $l = l^*(i)$.

Дополнительно формируются условия, учитывающие не только порядок следования оценок продуктов питания p_i и p_j по критериям адекватности $F_i(P)$, но и значения их разностей

$$d_{ij} = \{F_k(p_i) - F_k(p_j)\}, i \neq j, i = \overline{1, m}; k = \overline{1, n} \quad (5)$$

Эти условия, называемые индексом несогласия, могут быть оценены в виде $d_{ij} \leq d$, где d — пороговое значение индекса несогласия.

Отношение предпочтения (R) оптимальности продуктов питания определяется условием

$$a_i R a_j \Leftrightarrow f_s(\omega_{+j}, \omega_{=j}, \omega_{-j}) \geq C \wedge [d_j \leq d] \quad (6)$$

Предлагается не выделять недоминирующие варианты продуктов питания, а несколько расширить подмножество путем выделения в исходном множестве ядра, все альтернативы которого несравнимы между собой, и любой вариант, невошедший в ядро, доминируется хотя бы одной альтернативой ядра. Дальнейшее усечение вариантов может быть достигнуто заданием других более жестких ограничений, например, увеличением порогового значения индекса согласия C и уменьшением порога индекса несогласия.

Выводы

Анализ основных методов многокритериальной оценки в принятии управленческих решений показал, что наиболее эффективный — метод Парето. Согласно которому решение является оптимальным, если не существует другого решения, улучшающего значение одного из критериев без ухудшения при этом других критериев. Информационные технологии многокритериального выбора, реализуемыми методами математического программирования, позволяют спроектировать продукты питания по множеству различных критериев, структурировать полученное множество альтернатив (рационов, блюд, продуктов) и сделать обоснованное предпочтение оптимального продукта питания заданного качества, состава и свойств.

Introduction

Among many environmental factors that affect the human body, nutrition is one of the most important. Disorders of homeostasis are most often manifested by the symptom complex of deficiency of protein, protein-energy, vitamin and mineral nature, which leads to weakening of the immune-biological resistance of the body and can result in infectious diseases and a decrease in the effectiveness of pharmacological therapy.

The priority tasks of the state policy of the Russian Federation in the field of healthy nutrition are an increase in production and extension of an assortment of food products enriched with functional ingredients, specialized

foods, functional foods including those intended for nutrition in the organized groups, and biological active additives to food [1].

New smart technologies for production of specialized products oriented on personalization of nutrition and based on introduction of digital technologies will enable extension of food assortment, which will facilitate prevention of many noncommunicable diseases.

At present, the methods of linear, experimental statistical programming and object-oriented approach are mainly used for designing multi-component food recipes.

The process of optimization of recipe compositions is based on the use of the calculative criteria and concepts

proposed by Rogov I.A., Lipatov N.N. (Jr.), Lisitsyn A.B., Titov E.I., as well as on the methods of the systemic analysis, modeling and assortment and recipe optimization examined in the works of Kafarov V.V., Gordeev L.S., Protopopov I.I., Ivashkin Yu.A. et al.

The analysis of the scientific-technical and patent information about the modern trends and prospects of the product improvement by designing the nutrient and technological adequacy of the multi-component food mixtures (media) suggest that nowadays these questions also attract attention of prominent scientists.

Lipatov N.N. (Jr.) [2,3] carried out the studies on the issues of the computer-based design of products and diets with the targeted nutritional value. The initial stage of designing the theoretical foundations and specific methods for realization of the design principles for balanced food products was associated with formalization of the qualitative and quantitative concepts of the rational use of the essential amino acids. Formalization accounts for the mutual balance of the essential amino acids. Based on the principle of Mitchell and Block, he suggested the coefficient of amino-acid score difference, coefficient of amino acid composition utility and coefficient of comparable redundancy. Despite the theoretical substantiation, the experimental testing of the mutual balance of the essential amino acids includes the studies on the metabolism in the human body, which is quite complex [3].

To find the partial criterion, Lipatov N.N. (Jr.) used the Harrington's desirability function. The advantage of the function is its dimensionless, which allows modeling using the factors with different dimensions and ranges of values of varying variables. This approach has a disadvantage as it integrates many factors in one complex criterion, which significantly reduces a degree of model correctness.

When designing dairy products [4] with an increased biological value, the method of the experimental-statistical modeling based on the choice of the key nutrient of modeling and optimization of its quality was used.

In the study [5], the three stage method for designing recipes of gerodietetic meat products was proposed. The first stage is associated with modeling of the amino acid composition and a choice of values that meet the criteria to the highest degree; the second with the assessment of the fatty acid composition; the third with calculation of the energy value. The authors performed the process of modeling in the general form by the cyclic algorithm proposed by Lipatov N.N. (Jr.) [2].

Muratova E.I. et al. [6] used the modified method of hierarchy (or the Saaty method) and the objective-oriented approach to decisions. The peculiarity of this method is the presentation of a recipe as a hierarchical structure. Each peak of this structure is an object (the raw material — semi-finished product — finished product). Each level is a certain stage of the food production technology and, as a result, it can have the individual number of peaks located lower in the hierarchy. The algorithm of the multi-compo-

nent product calculation begins from calculating the last level from the longest path of the hierarchical structure of calculation.

Based on the mathematical models and recursive cycle, Borisenko A.A. [7] ensures obtaining a necessary set of options and compositions of multicomponent mixtures by the criteria of macro- and micronutrient composition.

Bessonova L.I. [8] developed the structured quality function for foods based on the detection of the autocorrelation function that allows constructing a predictive model for management of prospect indicators of technological processes, finished foods and services.

Sanina T.V. and Serbulov Yu.S. (2004) proposed a concept of the differentiated approach in the complex quality assessment of bakery products with enhanced nutritional value. The authors believe that for an objective assessment of an enhancement of the nutritional value, the priority in the choice of the determinative quality indicators should be on the consumer side and the quality assessment should include product indicators that satisfy certain needs according to its purpose [9].

Zaporozhsky A.A. et al. (2012) applied the methodological approach to constructing new gerodietetic products with the use of the principles of modern nutritiology, qualimetry and theoretical postulates of food combinatorics of neural network approximation of the theoretical (calculated) and experimental data for substantiation of recipes of new gerodietetic products with the targeted qualitative characteristics based on the natural raw materials [10].

Reznichenko I.Yu. et al. (2012) scientifically substantiated the complex product-technological approach to the development of functional foods enriched with biologically active substances and food fibers. During the investigation, he studied the factors that form quality of specialized products, determined the critical control points in the process of production and at the stage of product distribution with the aim of identification of the functional direction of a product, developed the nomenclature of the consumer properties including the indicators of the functional direction in addition to the organoleptic and physico-chemical indicators, and developed the algorithm of the expertise of the functional breakfast dry muesli bar [11].

Kiselev V.M. and Perchishina E.G. (2009) regarded production and consumption of functional products as a condition of a multifactor system based on the methodology of food combinatorics, parity of the needs and vital-concept with consideration for the modern requirements of food science and complex product quality assessment. Using this approach, a possibility of the evolutionary development of the process of functional food design based on the methodology of food combinatorics was studied, consumer preferences of functional foods were determined and systemized as a model of the consumer value [12].

The information aspects of modeling and assessment of the nutrient adequacy of raw materials and food products, which are the objects of food technologies, play an impor-

tant role in solution to the complex of problems associated with an improvement in quality and technologies of specialized multicomponent foods.

At present, different software products for automation of technological calculations of food recipes for different groups and diets have been developed and actively used: Etalon [13], ShkoOptiPit [14], «Development of recipes of compositions from plant raw materials» [15], Generic 2.0 [16], «Systems of calculations for foodservice industry» [17], CheesePro 1.0 [18], product «Vision-Soft: Nutrition in kindergarten» [19], »AVERS: calculation of nutrition menu» [20], Chef Expert [21] and so on.

All listed programs optimize a product and a diet based on a single criterion (as a rule, a criterion of the energy or nutritional value); other indicators (content of the specific macro- and micronutrients, their ratio) are taken into account as constraints.

However, many real problems in different spheres of research and management activities are connected with the multi-factor analysis of complex systems and emergence of the class of multi-criteria tasks for decision-making.

The aim of this work is to present the methodology of the multi-criteria model of food recipe optimization in different settings for different criteria of nutritional, biological and energy values, as well as amino acid, fatty acid, vitamin and mineral adequacy.

Objects and methods

The majority of the methods of multi-criteria optimization of decision-making are based on the idea of the existence of the so-called decision-maker. The main decision-makers are people. Their interests are subjective and serve as a basis for measuring different partial criteria. There are various methods for involving a person in the process of decision-making, on which basis different multi-criteria methods of decision-making are based. These methods can be conditionally divided into three large groups:

1 group. The methods based on determining preferences of a decision-maker and constructing a single criterion for solution quality before considering specific alternatives;

2 group. The dialogue iterative human-machine methods, which consist in the successive analysis of possible solutions with the gradual detection of preferences of a decision-maker and transition to a more preferable decision;

3 group. The methods based on the preliminary determination of a set of optimized (effective) solutions and presentation of this set to a decision-maker [22,23].

One of the most effective methods of multi-criteria optimization, when the number of assessment parameters is relatively low, is the Pareto method [24,24,25,26,27], which belongs to the 3rd group of methods. As the Pareto optimal solution can be not the only one, the concept of the Pareto optimal set of solutions as a set of non-dominated alternatives arises.

The Pareto method for solving a task. This is the method for demonstration of a system state, when a value

of each individual indicator characterizing a system cannot be improved without worsening the others. According to Pareto, «any change that harms no one and brings benefits to some people (according to their own estimation) is an improvement» [28]. Therefore, the right to all changes that do not bring any additional harm to anyone is acknowledged.

The concept of Pareto-optimal set. Definition: It is said that alternative A dominates alternative B, if alternative A is no worse than alternative B by all assessment criteria, and alternative A is better than alternative B at least by one assessment criterion. With that, alternative B is called dominated.

$$(y_p, y_j) \in R_p \rightarrow \forall_k: [f_k(y_i) \geq f_k(y_j)] \Delta [f(y_i) \neq f(y_j)], \begin{cases} f_1(x) \rightarrow \max \\ f_2(x) \rightarrow \max \end{cases}$$

If for some point $y^0 \in Y$, there is no Pareto-preferred point; i.e., such point y , when $(y, y^0) \in R_p$, then the point y^0 is called the Pareto efficient or Pareto optimal solution to the multi-criteria task (belongs to the Pareto set).

Construction of the Pareto set. The approximate construction of the Pareto set belongs to the group of very important and difficult tasks of the numerical analysis. With extension of a problem range, a significance of the methods for effective analysis of the Pareto set constantly increases.

The axioms that are a basis of the Pareto principle include:

- the axiom of exclusion of dominating solutions: for each pair of feasible solutions, for which there is a relation, it is satisfied;
- the Pareto axiom: for all pairs of feasible solutions, for which there is inequality, the relation is satisfied;
- the Pareto principle: the best solution of the multi-criteria task is always chosen from the Pareto-optimal set.

If it is impossible to establish preference for a pair of recipes (products), then, these diets are called incomparable. A solution is Pareto-optimal, if there is no solution which improves a value of one criterion without worsening other criteria.

As the Pareto-optimal solution can be not the only one, the concept of Pareto-optimal set of solutions arises as a set of non-dominated alternatives.

Results and discussions

In the tasks of the structural optimization of the composition of multi-component products with the targeted action (having specialized purpose), a set of criteria for selection of the optimal option includes the criteria for minimal deviation from the reference structures:

- amino acid composition of a product;
- fatty acid composition;
- vitamin content;
- microelement content,

as well as the criteria of food digestibility, nutritional, biological and energy value [29].

The initial set of criteria F_i ; $i = \overline{1, n}$ is open and can be complemented with other indicators and assessments of product quality, for example, food assimilability. Each recipe option (alternative) of the Pareto-optimal set of solutions for a given array of the initial recipe components corresponds to the extreme value of one of the criteria $\text{extr}\{F_1, \dots, F_n\}$ at the specified constraints.

The general task formulation for the multi-criteria choice of the optimal food product has the following form: $p = (p_1, p_2, \dots, p_n) \in P$ — a set of alternatives (food product recipes); $F_i(a_i)$ $i = \overline{1, m}$; $j = \overline{1, n}$ — a set of criteria for assessment of product recipes.

If the minimum of the criterion $F_i(p_j)$ corresponds to the best alternative (p_j), then the search for an optimal product recipe comes down to minimizing the vector criterion $F(P)$ on the set of alternatives P :

$$F(P) = \{F_1(p_j), F_2(p_j), \dots, F_m(p_j)\} \rightarrow \min_{p \in P} \quad (1)$$

In case of comparison of two recipes, $p_i \in P$ and $p_j \in P$, upon the condition $F_i(p_i) \leq F_j(p_j)$ for all $i, j = \overline{1, m}$, it is evident that the product p_i is no worse than the product p_j and if there is such $i = \overline{1, m}$, that $F_i(p_i) < F_j(p_j)$, then the product p_i is better than the product p_j .

Let us assume that $WP(P)$ is a set of incomparable recipes (products), then for $p^* \in P$ and any other $p \in P$ there is always such criterion $F_i(p)$ $i = \overline{1, m}$, for which $F_i(p^*) < F_i(p)$, and it can be concluded that product recipes represent the Pareto-optimal set

$$WP(P) = \{p^* \mid \forall p \in P (\exists i = \overline{1, m} [F_i(p^*) < F_i(p)])\} \quad (2)$$

Consequently, for a given product, we obtain a set of alternative solutions that correspond to the extreme values of the individual criteria without a possibility of the further improvement of other criteria without worsening the given one.

To assess and choose the best alternative (product), it is necessary to structurize alternatives by the criteria of adequacy. A set of assessed alternatives is entered into the «criterial table» (Table 1).

Table 1. Criterial matrix of alternatives

	F_1	F_2	...	F_i	...	F_m
P_1	x_{11}	x_{12}	...	x_{1i}	...	x_{1m}
P_2	x_{21}	x_{22}	...	x_{2i}	...	x_{2m}
...	...	...	...	...	...	...
P_j	x_{j1}	x_{j2}	...	x_{ji}	...	x_{jm}
...	...	...	...	...	...	...
P_n	x_{n1}	x_{n2}	...	x_{ni}	...	x_{nm}

where, x_{ij} — is an assessment of the i^{th} alternative (product) p_i by the criterion j^{th} (F_j) $i = \overline{1, m}$; $j = \overline{1, n}$.

To construct the binary preference by an expert in this field, the weight ω_i , which characterizes its importance, is assigned for each criterion F_i .

To compare the alternatives (products) p_i and p_j , the total set of criteria is divided into three subsets $\{I_+, I_-, I\}$:

$I_+(p_i, p_j)$ — criteria, by which the recipes of the product p_i are superior to the recipes of the product p_j ;

$I_-(p_i, p_j)$ — criteria, by which the recipes of the product p_i and the recipes of the product p_j have the equivalent assessment results;

$I(p_i, p_j)$ — criteria, by which the recipes of the product p_j are superior to the recipes of the product p_i .

Then, the relative importance ω_{+ij} , $\omega_{=ij}$, ω_{-ji} of each of these subsets is determined by expertise. In addition, a certain threshold C is set and it is considered that the product p_i is superior to the product p_j only in the case when the function f_s (index of agreement) satisfies the condition

$$f_s(\omega_{+j}, \omega_{=j}, \omega_{-j}) \geq C \quad (3)$$

An importance of the groups of criteria $I_+(p_i, p_j)$, $I_-(p_i, p_j)$, $I(p_i, p_j)$ is determined as a sum of weights of the included criteria

$$\omega^* = \sum \omega_i \quad (4)$$

where, $*$ $\in \{+, -, =\}$; $l = I^*(i)$.

Additionally, the conditions are formed that take into account not only the sequence order of assessment results for food products p_i and p_j by the criteria of adequacy $F_i(P)$, but also the values of their differences

$$d_{ij} = \{F_k(p_i) - F_k(p_j)\}, i \neq j, i = \overline{1, m}; k = \overline{1, n} \quad (5)$$

These conditions, called the *index of disagreement* can be assessed as $d_{ij} \leq d$, where d is the threshold value of the index of disagreement.

The preference relation (R) for food product optimality is determined by the condition

$$a_i R a_j \Leftrightarrow f_s(\omega_{+j}, \omega_{=j}, \omega_{-j}) \geq C \wedge [d_j \leq d] \quad (6)$$

It is proposed not to select non-dominating options of food products, but slightly extend a subset by choosing a nucleus in the initial set, all alternatives of which are incomparable to each other and any option that is not included in the nucleus is dominated by at least one alternative of the nucleus. The following reduction of options can be achieved by assigning other tighter constraints, for example by increasing the threshold value for the index of agreement C and decreasing the threshold value for the index of disagreement.

Conclusions

Analysis of the main methods of the multi-criteria assessment in managerial decision making showed that the most effective of them is the Pareto method. According to this method, a solution is optimal, if there is no another solution that improves the value of one of the criteria without worsening the others. The information technologies of the multi-criteria choice, realized by the methods of mathematical programming allows designing food products by several different criteria, structurizing the obtained set of alternatives (diets, dishes, products) and determining the substantiated preference of the optimal food product with the targeted quality, composition and properties.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Основы государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года: Распоряжение Правительства РФ № 1873-р от 25 октября 2010 г. [Электронный ресурс: <http://docs.cntd.ru/document/902242308> Дата обращения 22.06.2018]
2. Липатов, Н.Н., Рогов, И.А. (1987). Методология проектирования продуктов питания с требуемым комплексом показателей пищевой ценности. *Известия вузов. Пищевая технология*, 2, 9–15.
3. Липатов, Н.Н. (1990). Принципы и методы проектирования рецептур продуктов, балансирующих рационы. *Известия вузов. Пищевая технология*, 6, 5–10.
4. Лисин, П.А. (2007). Компьютерные технологии в рецептурах расчета молочных продуктов. М, ДеЛи принт. — 102 с.
5. Сатина, О.В., Юдина, С.Б. (2010). Информационные технологии проектирования продуктов геронтологического питания. *Мясная индустрия*, 6, 56–58.
6. Муратова, Е.И., Толстых, С.Г., Дворецкий С.И., Зюзина, О.В., Леонов, Д.В. (2011). Автоматизированное проектирование сложных многокомпонентных продуктов питания: Учебное пособие. Тамбов, ТГТУ. — 80 с.
7. Борисенко, А.А. (2006). Алгоритм моделирования поликомпонентных смесей с использованием рекурсивного цикла и реляционной базы данных. *Информационные технологии*, 7, 69–71.
8. Бессонова, Л.П. (2009). Научная основа и практическая значимость использования метода QFD в улучшении качества пищевых продуктов. М., Изд-во Истоки. — 200 с.
9. Санина, Т.В., Сербулов, Ю.С. (2004). Дифференцированный подход в комплексной оценке качества хлебобулочных изделий. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 5, 47–50.
10. Запорожский, А.А., Запорожская, С.П., Ковтун, Т.В., Ревенко, М.Г. (2012). Перспективы научных исследований в области разработки продуктов геродиетического назначения. *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*, 2–3(326–327), 5–9.
11. Резниченко, И.Ю., Алешина, Ю.А., Галиева, А.И., Егорова, Е.Ю. (2012). Методология проектирования кондитерских изделий функционального назначения. *Пищевая промышленность*, 9, 28–30.
12. Киселев, В.М., Першина, Е.Г. (2009). Эволюционная методология проектирования функциональных продуктов питания. *Пищевая промышленность*, 11, 57–59.
13. Борисенко, А.А. (2005). «Etalon»: Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2005610751. М., Роспатент.
14. Колесникова, Н.Г., Бородин, А.С., Шамкова, Н.Т., Зайко, Г.М., Григорьев, А.С. (2005). Электронный ресурс для расчета рационов школьного питания (ШкоОпПиТ): Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2005612711. М., Роспатент.
15. Бугаец, И.А., Москаленко, Ф.В., Тамова, М.Ю., Бугаец, Н.А. (2007). Разработка рецептур композиций из растительного сырья (РКРС): Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2007610187. М., Роспатент.
16. Запорожский, А.А., Запорожский, В.А. (2005). Программа для автоматизированного проектирования, расчета и оценки качества многокомпонентных рецептур пищевых продуктов (Generic-2.0): Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2005611720. М., Роспатент.
17. Гращенков, Д.В., Николаева, Л.И. (2002). Система расчетов для общественного питания: Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2002610284. М., Роспатент.
18. Кравченко, Э.Ф., Дунаев, А.В., Волкова, Т.А. (2010). Продукты из вторичного молочного сырья для рецептур плавящихся сыров. *Сыроделие и маслоделие*, 2, 14–17.
19. Вижен-софт: автоматизация питания [Электронный ресурс: http://pitaniesoft.ru/nutrition_programs/baby_food/. Дата обращения 22.04.2018]
20. УМК «Работа с ИАС «Аверс: Расчет меню питания» [Электронный ресурс: <http://www.avers-edu.ru/UMK/index0.html>. Дата обращения 22.04.2018]
21. ChefExpert: Правильные документы для общепита [Электронный ресурс: <https://www.chefexpert.ru>. Дата обращения 22.04.2018]
22. Трифонов, А.Г. Многокритериальная оптимизация. [Электронный ресурс: http://matlab.exponenta.ru/optimiz/book_1/16.php. Дата обращения 18.05.2018]
23. Штойер, Р. (1992). Многокритериальная оптимизация. Теория, вычисления и приложение / пер. с англ. М, Радио и связь. — 504 с.
24. Eichfelder, G. (2008). Adaptive scalarization methods in multiobjective optimization. Springer Berlin Heidelberg. [Электронный ресурс: doi: 10.1007/978-3-540-79159. Дата обращения 08.01.2018]
25. Fliege, J., Drummond, L.M.G., Svaiter, B.F. (2009). Newton's method for multiobjective optimization. *Journal on Optimization*, 2(20), 602–626.
26. Yu, Po-Lung (1985). Multiple- criteria decision making: concepts, techniques and extensions. Springer US. — 402 p.
27. Поддиновский, В.В. (1982). Парето-оптимальные решения многокритериальных задач. М, Наука. — 256 с.
28. Эффективность по Парето [Электронный ресурс: ru.wikipedia.org. Дата обращения 25.06.2018]
29. Титов, Е.И., Рогов, И.А., Ивашкин, Ю.А., Никитина, М.А., Глазкова, И.В., Митасева, Л.Ф. (2009). Экспертная система оптимизации состава продуктов и рационов питания. М., МГУПБ. — 124 с.

REFERENCES

1. The basics of the state policy of the Russian Federation in the field of the healthy nutrition of the population for the period up to 2020: Decree of the Government of the Russian Federation no. 1873-p of October 25, 2010. [Electronic resource: <http://docs.cntd.ru/document/902242308> Access date 22.06.2018]. (in Russian)
2. Lipatov, N.N., Rogov I.A. (1987). Methodology of food design with the required complex of food value indicators. *Izvestia vuzov. Pishhevaya tekhnologiya*, 2, 9–15. (in Russian)
3. Lipatov, N.N. (1990). Principles and methods for recipe design of products that balance diets. *Izvestia vuzov. Pishhevaya tekhnologiya*, 6, 5–10. (in Russian)
4. Lisin, P.A. (2007). Computer technologies in the recipe calculations for dairy products. M: DeLi print. — 102 p. (in Russian)
5. Satina, O.V., Yudina, S.B. (2010) Information technologies for designing products of gerontological nutrition. *Meat Industry*, 6, 56–58. (in Russian)
6. Muratova, E.I., Tolstyh, S.G., Dvoretzkyi, S.I., Zuyzina, O.V., Leonov, D.V. (2011). Automated design of complex multi-component food products: textbook. Tambov: TSTU. — 80 p. (in Russian)
7. Borisenko, A.A. (2006). Algorithm of modeling multi-component mixtures with the use of the recursive cycle and relation database. *Information technologies*, 7, 69–71. (in Russian)
8. Bessonova, L.P. (2009). Scientific basis and practical significance of the use of QFD method in improvement of food product quality. M: Publishing House Istoki. — 200 p. (in Russian)
9. Sanina, T.V., Serbulov, Yu.S. (2004). Differentiated approach in the complex assessment of bakery product quality. *Storage and processing of farm products*, 5, 47–50. (in Russian)
10. Zaporozhskaya, S.P., Kovtun, T.V., Revenko, M.G. (2012). Prospects of scientific investigations in the field of gerontological food development. *Izvestia vuzov. Pishhevaya tekhnologiya*, 2–3(326–327), 5–9. (in Russian)
11. Reznichenko, I.Yu., Alechina, Yu.A., Galieva, A.I., Egorova, E.Yu. (2012). Methodology of design of confectionery products of functional purpose. *Food Industry*, 9, 28–30. (in Russian)
12. Kiselev, V.M., Pershina, E.G. (2009). Evolutional methodology of functional food design. *Food Industry*, 11, 57–59. (in Russian)
13. Borisenko, A.A. (2005). «Etalon»: Certificate of official registration of the computer program No. 2005610751. Moscow: Rospatent. (in Russian)
14. Kolesnikova, N.G., Borokikhin, A.S., Shamkova, N.T., Zaiko, G.M., Grigoriev, A.S. (2005). Electronic resource for calculation of rations for school feeding (ShkoOptiPit): Certificate of official registration of the computer program No. 2005612711. Moscow: Rospatent. (in Russian)
15. Bugaets, I.A., Moskalenko, F.V., Tamova, M.Yu., Bugaets, N.A. (2007). Development of the recipe compositions from plant raw materials (RCPRM): Certificate of official registration of the computer program No. 2007610187. Moscow: Rospatent. (in Russian)
16. Zaporozhsky, A.A., Zaporozhsky, V.A. (2005). Program for automated design, calculation and assessment of quality of multi-component recipes of food products (Generic-2.0): Certificate of

official registration of the computer program No. 2005611720. Moscow: Rospatent. (in Russian)

17. Grashchenkov, D.V., Nikolaeva, L.I. (2002). The system of calculations for catering industry: Certificate of official registration of the computer program No. 2002610284. Moscow: Rospatent. (in Russian)

18. Kravchenko, E.F., Dunaev, A.V., Volkova, T.A. (2010). Products from secondary dairy raw material for melted cheese recipes. *Cheesemaking and buttermaking*, 2, 14–17. (in Russian)

19. Vision-Soft: Automation of nutrition [Electronic resource: http://pitaniessoft.ru/nutrition_programs/baby_food/. Access date 22.04.2018] (in Russian)

20. UMC «Work with IAS «Avers: Calculation of nutrition menu» [Electronic resource: <http://www.avers-edu.ru/UMK/index0.html>. Access date 22.04.2018] (in Russian)

21. ChefExpert: Right documents for foodservice industry [Electronic resource: <https://www.chefexpert.ru>. Access date 22.04.2018] (in Russian)

22. Trifonov, A.G. Multi-criteria optimization. [Electronic resource: http://matlab.exponenta.ru/optimiz/book_1/16.php. Date of circulation 05.18.2018]

23. Steuer, R.E. (1992). *Multiple Criteria Optimization: Theory, Computation, and Application* / translation from English. M: Radio and connection. — 504 p.

24. Eichfelder, G. (2008). *Adaptive scalarization methods in multiobjective optimization*. Springer Berlin Heidelberg. [Electronic resource: doi: 10.1007/978-3-540-79159. Date of circulation 01.08.2018]

25. Fliege, J., Drummond, L.M.G., Svaiter, B.F. (2009). Newton's method for multiobjective optimization. *Journal on Optimization*, 2(20), 602–626.

26. Yu, Po-Lung (1985). *Multiple-criteria decision making: concepts, techniques and extensions*. Springer US. — 402 p.

27. Poddinovskiy, V.V. (1982). *Pareto-optimal solutions to multi-criteria tasks*. M: Nauka. — 256 p. (in Russian)

28. Pareto efficiency [Electronic resource: ru.wikipedia.org. Date of circulation 06.25.2018]

29. Titov, E.I., Rogov, I.A., Ivashkin, Yu.A., Nikitina, M.A., Glazkova, I.V., Mitaseva, L.F. (2009). *Expert system for optimization of product composition and nutrition rations*. M: MGUPB. — 124 p. (in Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Никитина Марина Александровна — кандидат технических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, руководитель направления Информационных технологий Центра «Экономико-аналитических исследований и информационных технологий», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26

Тел.: +7-495-676-92-14

E-mail: m.nikitina@fncps.ru

*автор для переписки

Чернуха Ирина Михайловна — доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ведущий 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

Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 28.08.2018

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Marina A. Nikitina — candidate of technical sciences, docent, leading scientific worker, the Head of the Direction of Information Technologies of the Center of Economic and Analytical Research and Information Technologies, V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel: +7-495-676-92-14

E-mail: m.nikitina@fncps.ru

*corresponding author

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

Contribution

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 28.08.2018