



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

# ***THEORY AND PRACTICE OF MEAT PROCESSING***

# ***ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ПЕРЕРАБОТКИ МЯСА***

Vol. 2 (I), 2017

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

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение «Всероссийский  
научно-исследовательский институт мясной  
промышленности имени В.М. Горбатова»  
Federal State Budgetary Scientific Institution  
«The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute»  
(FGBNU V.M. Gorbатов VNIIMP).

**Теория и практика переработки мяса**  
Theory and Practice of Meat Processing

**Учредитель и издатель:** **Founder and publisher:**  
Федеральное государственное бюджетное научное  
учреждение «Всероссийский научно-исследовательский  
институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова»  
Federal State Budgetary Scientific Institution  
«The V.M. Gorbатов All-Russian  
Meat Research Institute»

**Главный редактор:**  
**Лисицын Андрей Борисович**, доктор технических  
наук, профессор, академик РАН, директор ФГБНУ  
«Всероссийский научно-исследовательский институт  
мясной промышленности им. В.М. Горбатова»,  
г. Москва, Россия

**Заместитель главного редактора:**  
**Чернуха Ирина Михайловна**, доктор технических  
наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный  
научный сотрудник ФГБНУ «Всероссийский  
научно-исследовательский институт мясной  
промышленности им. В.М. Горбатова», г. Москва,  
Россия

**Научный редактор:**  
**Горбунова Наталия Анатольевна**, кандидат  
технических наук, ученый секретарь ФГБНУ  
«Всероссийский научно-исследовательский институт  
мясной промышленности им. В.М. Горбатова»,  
г. Москва, Россия

**Выпускающий редактор:**  
**Захаров Александр Николаевич**, кандидат  
технических наук, старший научный сотрудник,  
заместитель директора ФГБНУ «Всероссийский  
научно-исследовательский институт мясной  
промышленности им. В.М. Горбатова»,  
г. Москва, Россия.

Printing Office:  
109316, Talalikhina str. 26, Moscow, Russia,  
The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute.  
www.meatjournal.ru

Журнал зарегистрирован в Роскомнадзоре  
Регистрационные данные:  
ПИ № ФС77-60789 от 11.02.2015 года  
ЭЛ № ФС 77-60810 от 11.02.2015 года  
Периодичность — 4 номера в год.  
Издается с 2015 года.  
Подписано в печать 31.03.17.  
Тираж 1000 экз. Заказ № 509.  
Типография ВНИИМП.

© ВНИИМП, 2017

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, научный руководитель ФГБНУ «Всероссийский  
научно-исследовательский институт холодильной  
промышленности», 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 ФГБОУВО «Российский  
государственный аграрный университет имени  
К.А. Тимирязева», Москва, Россия  
**Жайлаубаев Жанибек Далелович**, доктор технических  
наук, член корреспондент АСХН РК, директор СФ  
ТОО «Казахский научно-исследовательский институт  
перерабатывающей и пищевой промышленности»,  
г. Семей, Республика Казахстан  
**Замарацкая Галя**, 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  
**Мелещенко Алексей Викторович**, кандидат экономических  
наук, директор НПРДУП «Институт мясо-молочной  
промышленности», г. Минск, Республика Беларусь  
**Мирошников Сергей Александрович**, доктор  
биологических наук, профессор, директор ФГБНУ  
«Всероссийский научно-исследовательский институт  
мясного скотоводства», г. Оренбург, Россия  
**Римарева Любовь Вячеславовна**, доктор технических  
наук, профессор, чл.-корр. 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  
«Всероссийский научно-исследовательский институт мясной  
промышленности им. В.М. Горбатова», г. Москва, Россия  
**Тимошенко Николай Васильевич**, доктор технических  
наук, профессор, заведующий кафедрой технология  
хранения и переработки животноводческой продукции  
Кубанского ГАУ, г. Краснодар, Россия.

**Федеральное агентство  
научных организаций**

**Federal Agency of Scientific Organizations  
(FANO of Russia)**

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение «Всероссийский  
научно-исследовательский институт мясной  
промышленности имени В.М. Горбатова»  
Federal State Budgetary Scientific Institution  
«The V.M. Gorbatov All-Russian Meat Research Institute»  
(FGBNU V.M. Gorbatov VNIIMP)

**Теория и практика переработки мяса  
Theory and Practice of Meat Processing**

**Учредитель и издатель:** **Founder and publisher:**  
Федеральное государственное бюджетное научное  
учреждение «Всероссийский научно-исследовательский  
институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова»  
Federal State Budgetary Scientific Institution  
«The V.M. Gorbatov All-Russian  
Meat Research Institute»

**Editor-in-Chief:**

**Lisitsyn Andrey Borisovich**, doctor of technical  
sciences, professor, Academician of RAS,  
Laureate of the state prize of the Russian Federation  
in the field of science and technique, Director  
of FGBNU «The V.M. Gorbatov All-Russian  
Meat Research Institute», Moscow, Russia

**Deputy Editor-in-Chief:**

**Chernukha Irina Mikchailovna**, doctor of technical  
sciences, professor, corresponding members of RAS,  
chief research worker, FGBNU «The V.M. Gorbatov  
All-Russian Meat Research Institute», Moscow, Russia

**Science editor:**

**Gorbunova Natalia Anatolievna**, candidate  
of technical sciences, Academic Secretary of FGBNU  
«The V.M. Gorbatov All-Russian Meat Research  
Institute», Moscow, Russia

**Production editor:**

**Zakharov Aleksandr Nikolaevich**, candidate of technical  
sciences, senior research worker, deputy director of  
FGBNU «The V.M. Gorbatov All-Russian Meat Research  
Institute», Moscow, Russia

**Printing Office:**

109316, Talalikhina str. 26, Moscow, Russia,  
The V.M. Gorbatov All-Russian Meat Research Institute.  
www.meatjournal.ru

Журнал зарегистрирован в Роскомнадзоре

Регистрационные данные:

ПИ № ФС77-60789 от 11.02.2015 года

ЭЛ № ФС 77-60810 от 11.02.2015 года

Frequency — 4 issues a year.

Published in 2015.

Signed print 31.03.17.

Circulation — 1000 copies. Order № 509.

Printing house — VNIIMP.

© ВНИИМП, 2016

ISSN 2414-438X (Print)

ISSN 2414-441X (Online)

**Editorial board:**

**Bazhenova Baiana Anatolievna**, 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

**Belozeroz Georgy Avtonomovich**, doctor of technical sciences,  
Scientific supervisor of FGBNU «The All-Russian Scientific  
Research Institute of Refrigeration Industry», Moscow, Russia

**Gorlov Ivan Fedorovich**, 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

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

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

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

**Zhailaubayev Zhinibek Dalelovich**, doctor of technical sciences,  
corresponding member 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

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

**Kochetkova Alla Alekseevna**, 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

**Meliashchenia Aliaksei Viktorovich**, 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

**Miroshnikov Sergey Alexandrovich**, doctor of biological  
sciences, professor, Director of FGBNU «The All-Russian  
Research Institute of Beef Cattle», Orenburg, Russia

**Rimareva Liubov Vyacheslavovna**, doctor of technical sciences,  
professor, corresponding member 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

**Rud Andrey Ivanovich**, 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

**Ryoichi Sakata**, PhD, doctor, professor of agricultural sciences,  
Azabu University, Sagamihara, Japan

**Semenova Anastasiya Arturovna**, doctor of technical sciences,  
professor, Deputy Director of FGBNU «The V.M. Gorbatov  
All-Russian Meat Research Institute», Moscow, Russia

**Timoshenko Nikolai Vasilievich**, 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

## СОДЕРЖАНИЕ

Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. БИОИНФОРМАТИКА — ИНСТРУМЕНТ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПРОТЕОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ БЕЛКОВ МЯСА .....	4
Замаратская Г., Ли С. ПРОТЕОМИКА В НАУКЕ О МЯСЕ — СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ.....	18
Минаев М.Ю., Солодовникова Г.И., Курбаков К.А. ВЫБОР ДНК МАТРИЦЫ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ ПОРОГОВОГО УРОВНЯ ТЕХНИЧЕСКИ НЕУСТРАНИМЫХ ПРИМЕСЕЙ МЯСА ПТИЦЫ В ГОТОВОЙ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	27
Крылова В.Б., Густова Т.В. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИНАМИКА ДЕСТРУКЦИИ БЕЛКОВ КОНСЕРВОВ В СОУСЕ ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ И ПОСЛЕДУЮЩЕМ ХРАНЕНИИ.....	37
Туниева Е.К., Горбунова Н.А. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СОЛИ В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ .....	47
Дыдыкин А.С., Минаев М.Ю., Толмачева Г.С., Мусатова А.А. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МОДЕЛЬНЫХ МЯСНЫХ СИСТЕМ НА АЛЛЕРГИЧЕСКУЮ РЕАКЦИЮ ИММУНИТЕТА IN VIVO .....	57
Бородин А.В., Чернуха И.М., Никитина М.А. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКИХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ПО ТРОФОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕПИ ПРОИЗВОДСТВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ ОТ ПОЛЯ ДО ПОТРЕБИТЕЛЯ.....	69
Ковалева О.А., Здрабова Е.М. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ БЕЛКОВ СЫРОВАЛЕННЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ ГОВЯДИНЫ С ГИПОТЕНЗИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ .....	84

## CONTENTS

Vostrikova N.L., Chernukha I.M. BIOINFORMATICS — INSTRUMENT INTERPRETATION PROTEOMIC PROFILES OF MEAT PROTEIN .....	4
Zamaratskaia G., Li S. PROTEOMICS IN MEAT SCIENCE — CURRENT STATUS AND FUTURE PERSPECTIVE .....	18
Minaev M.Yu, Solodovnikova G.I., Kurbakov K.A. SELECTION OF DNA MATRIX FOR JUSTIFICATION OF THRESHOLD FOR CONTAMINATION OF PROCESSED MEAT PRODUCTS WITH UNDECLARED POULTRY COMPONENTS .....	27
Krylova V.B., Gustova T.V. COMPARATIVE DYNAMICS OF PROTEIN DESTRUCTION IN CANNED FOODS IN SAUCE AT DIFFERENT THERMAL TREATMENT REGIMES AND SUBSEQUENT STORAGE .....	37
Tunieva E.K., Gorbunova N.A. ALTERNATIVE METHODS OF TECHNOLOGICAL PROCESSING TO REDUCE SALT IN MEAT PRODUCTS .....	47
Dydykin A.S., Minaev M.Y., Tolmacheva G.S., Musatova A.A. THE STUDY OF THE INFLUENCE OF MODEL MEAT SYSTEMS ON THE ALLERGIC IMMUNE RESPONSE IN VIVO .....	57
Borodin A.V., Chernukha I.M., Nikitina M.A. CRITICAL CONTROL POINT IDENTIFICATION THROUGH TROPHOLOGICAL MEAT PRODUCTION CHAINFROM FIELD TO FORK.....	69
Kovaleva O.A, Zdrabova E.M STUDY ON THE BIOLOGICAL VALUE OF PROTEINS WITH HYPOTENSIVE PROPERTIES FROM AIR-DRIED BEEF.....	84

# BIOINFORMATICS — INSTRUMENT INTERPRETATION PROTEOMIC PROFILES OF MEAT PROTEIN

## БИОИНФОРМАТИКА — ИНСТРУМЕНТ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПРОТЕОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ БЕЛКОВ МЯСА

Vostrikova N.L., Chernukha I.M.

The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute, Moscow, Russia

**Ключевые слова:** биоинформатика, протеомика, белки, базы данных, двумерный электрофорез, протеомный профиль белка.

**Keywords:** bioinformatics, proteomics, protein database, two-dimensional electrophoresis, protein proteomic profile.

### Аннотация

Протеомные технологии оказались весьма эффективными для выявления в мясных продуктах биохимических изменений, таких как изменения термоустойчивых и видоспецифичных белков, способных стать соответствующими биомаркерами. В работе, представленной в данном обзоре (в период с 2013–2016 гг), с помощью протеомных технологий в исследуемых образцах мяса и в специально выработанных мясных изделиях, было определено несколько тканеспецифичных белков, которые были определены как индивидуальные биомаркеры при контроле мясных изделий.

Существование огромного количества разнообразных белков привело к необходимости создания информационных массивов — баз (или банков) данных. В настоящее время существует множество общих и специализированных баз данных, которые доступны в Интернете каждому желающему. При исследовании протеомных профилей белков, многие ученые останавливаются на этапе получения двумерных электрофореграмм, не имея порой даже представления о дальнейших перспективах использования современных инструментальных и биоинформационных ресурсов, позволяющих подтвердить или опровергнуть их гипотезы, а порой просто идентифицировать. В данной статье представлена цепочка действий, позволяющих пройти путь от получения профиля белков на геле, до конкретной интерпретации полученного результата. Выполнение исследований в данном направлении позволило сформулировать и значительно расширить подходы к идентификации и количественному определению белковых маркеров качества, функциональности и безопасности мясного сырья (выявления фальсификации) в готовых мясных продуктах. По полученным данным систематизирована информация с помощью методов биоинформатики, позволившая создать уникальный Атлас «Протеомные профили белков мяса сельскохозяйственных животных».

### Введение

Существование огромного количества разнообразных белков привело к необходимости создания информационных массивов — баз (или банков) данных, в которые заносились бы все известные о них сведения. В настоящее время существует множество общих и специализированных баз данных, которые доступны в Интернете каждому желающему.

В общих базах содержатся сведения обо всех известных белках живых организмов, т.е. о глобальном протеоме всего живого. Примером такой базы явля-

### Abstract

Proteomic technologies have proven very effective for detection in meat products of biochemical changes, such as changes in heat resistant and species-specific proteins that could be relevant biomarkers.

In the work presented in this report (for the period of 2013–2016), several tissue-specific proteins were detected in the samples of meat and specially developed meat products using proteomic technologies and identified as individual biomarkers in meat product control.

The existence of a large number of different proteins resulted in the need to create information arrays — databases (or banks). Currently, there are a number of general and specialized databases that are available online to anyone interested. When studying protein proteomic profiles, many scientists stop at the stage of two-dimensional electrophoregrams sometimes even without ideas about the future prospects of using modern instruments and bioinformation resources to confirm or refute their hypotheses, and sometimes just to identify. This overview shows the chain of actions that allows going from profiling proteins in the gel to a specific interpretation of the results. Studies in this field have enabled formulating and significantly expanding the approaches to the identification and quantification of protein markers of quality, functionality and safety of meat raw material (detection of falsification) in the finished meat products. Based on the obtained data, the information was systematized using bioinformatics techniques with creation of the unique Atlas «Proteomic profiles of farm animal meat proteins.»

### Introduction

The existence of a huge number of different proteins has led to the necessity of creating information arrays, i.e. databases, for entering all known information about them. At present, there are many general and specialized databases, which are available to everyone through the Internet.

The general databases contain information about all known proteins of living organisms, i.e., about the global proteome of all living things. An example of such database

ется SwissProt-TrEMBL (Швейцария–Германия), в которой на сегодняшний день содержатся структуры почти 200 000 белков, установленные аналитическими методами, и еще почти 2 млн структур, которые определены в результате трансляции с нуклеотидных последовательностей [1].

В глобальном протеоме особое место занимают небольшие очень подвижные молекулы, содержащие не более 50 аминокислотных остатков и обладающие специфическим спектром функциональной активности. Они называются олигопептидами, или просто пептидами. Для них, т.е. для глобального пептидома, создан особый банк данных, который называется EROP-Moscow. Это название представляет собой аббревиатуру от термина Endogenous Regulatory OligoPeptides (эндогенные регуляторные олигопептиды), и указывает на то, что банк создан и базируется в столице нашей страны [2].

На сегодняшний день расшифрована структура почти 6000 олигопептидов, выделенных из представителей всех царств живого. Однако следует отметить, что, ввиду огромного структурного и функционального разнообразия, как белков, так и пептидов, для них до сих пор не создано строгой классификации.

Таким образом, в данном случае задачами биоинформатики являются накопление информации о физико-химических и биологических свойствах белков, анализ этой информации, каталогизация и подготовка информационной базы и вычислительных средств для выявления механизмов их функционирования [3]. Протеомика — последовала за геномикой. Когда был частично расшифрован геном человека, возникли, так называемые постгеномные технологии. Они так называются потому, что основываются на информации, обнаруженной в геноме. Расшифровка генома человека, представляющего собой огромную матрицу, где содержится вся информация о человеке и о каждой клетке его организма, — длительное, мучительное и даже неблагоприятное занятие. Это чисто механическая работа, которая идет до победного конца, а концом является просто перечень букв, огромный список, книга с буквами и всё. Всё остальное — это уже дальнейшее, «постгеномика».

Изучением и расшифровкой генетической информации в высокопроизводительном масштабе занимается геномика. Данные ее исследований позволили приступить к изучению РНК и белка, которые находятся уже «за» геномом. Нужно при этом понимать, чем геномика отличается от генетики. Если генетика — это изучение частного, то геномика — изучение всего генетического материала (геном — его совокупность).

О протеомике, которая занимается инвентаризацией белков, впервые заговорили за рубежом в середине 90-х гг. Ее основной метод — определение совокупности белков в каких-то образцах и одновременно срав-

is SwissProt-TrEMBL (Switzerland –Germany), which currently contains the structures of almost 200,000 proteins detected by the analytical methods and about 2 million structures, which were determined as a result of nucleotide sequence translation. [1].

A special place in the global proteome is occupied by very mobile small molecules that contain no more than 50 amino acid residues and have specific spectra of functional activity. They are called oligopeptides or simply peptides. For them, i.e., for the global peptidome, a specific data bank EROP-Moscow was created. This name is an abbreviation of the term Endogenous Regulatory OligoPeptides and indicates that the bank was created and is located in the capital of our country [2].

Up to date, the structure of approximately 6000 oligopeptides isolated from representatives of all biological kingdoms has been deciphered. However, it is necessary to note that due to the huge structural and functional variability of both proteins and peptides, their strict classification has not been developed to the present day.

Therefore, in this case, the objectives of bioinformatics are accumulation of knowledge about physico-chemical and biological properties of proteins, analysis of this information, cataloguing and preparation of an information base and computation tools to establish the mechanisms of their function [3]. Proteomics followed the genomics. When the human genome was partly deciphered, the so-called post-genomic technologies emerged. They were given this term because they are based on information revealed in the genome. The decryption of the human genome, which represents an enormous matrix containing all information about humans and each cell of their organism, is time-consuming, torturous and even thankless task. It is purely mechanical work, which is performed up to the bitter end and the result is simply a list of letters, a huge list, a book with letters and nothing more. Everything else is the following — postgenomics.

Genomics deals with the research and decryption of the genetic information in the high-throughput scale. The data from its studies make it possible to approach to the analysis of RNA and proteins, which are beyond the genome. With that, it is necessary to understand that genomics is different from genetics. While genetics is a study of particulars, genomics is a study of the whole genetic material (genome is its complex).

Proteomics, which deals with protein «inventories», was talked about for the first time abroad in the middle of the 1990s. Its main method is detection of protein sets in some samples and then comparison of these sets with

нение этих комплексов с другими образцами. Очень важно знать, какие белки экспрессируются в клетках, например, патологических организмов. Вообще, особенностью многоклеточных животных является то, что геном их клеток похож, а сами клетки не похожи: эпителиальные, кровяные, клетки печени и т.д. Вот эту загадку — почему во всех клетках геном плюс-минус одинаковый, а клетки все разные — и необходимо разрешить с помощью постгеномных технологий. Основными задачами и геномики, и протеомики является технологическое составление базы данных [4].

Биоинформатика — наука, занимающаяся изучением биологической информации с помощью математических, статистических и компьютерных методов с использованием вычислительной техники, математики и информационной теории для анализа и моделирования молекулярно-биологических систем, в особенности систем, состоящих из генов, РНК, белков и метаболитов и др. Но прежде, чем подробнее остановиться на информационных ресурсах биоинформатики немного познакомимся с практической протеомикой [5].

Итак, главной задачей протеомики является выявление механизма взаимодействия огромного числа белков и пептидов в одном организме. Какова же практическая значимость этой грандиозной и дорогостоящей работы? Очевидно, что в первую очередь в результатах такой работы заинтересованы фармакологи и медики, поскольку очень часто прослеживается тесная связь между изменениями в белковом составе и болезненным состоянием человека. Поэтому новые данные в протеомике будут использоваться (и уже используются) для быстрой разработки новых лекарственных средств и новейших методов лечения болезней, с которыми медицина боролась веками. На сегодняшний день 95% всех фармакологических средств воздействуют на белки. Протеомика со своим системным подходом может помочь идентифицировать и оценить важность появления новых белков гораздо эффективнее, что, в свою очередь, ускорит разработку новых диагностических тестов и терапевтических средств.

Первое практическое применение протеомных исследований состоялось задолго до появления термина «протеомика», еще в начале XX в., когда была обнаружена роль инсулина в развитии такого тяжелого заболевания, как диабет. Создание инсулиновых препаратов спасло жизнь миллионам людей.

В настоящее же время протеомика, вместе с геномикой и биоинформатикой, ориентирована на создание новых лекарственных препаратов, в которых молекулярными мишенями будут служить те или иные белки. Процесс нахождения новых мишеней для действия лекарств решается с помощью биоинформатики, причем объектом анализа является геном. Однако после анализа генома необходимо получить доказательства того, что данный белок интенсивно

other samples. It is very important to know what proteins are expressed in cells of pathological organisms, for example. In general, the peculiarity of the multicellular animals is the fact that the genome of their cells is similar, but the cells (epithelial, blood, hepatic etc.) are not. This puzzle — why the genome is similar in all cells and cells are different — is necessary to solve using postgenomic technologies. The main tasks of both genomics and proteomics are technological development of databases [4].

Bioinformatics is a science that study the biological information by the mathematical, statistical and computer methods using computational apparatus, mathematics and information theory for analysis and modeling of molecular-biological systems, in particular, systems consisting of genes, RNA, proteins, metabolites and so on. However, before discussing the information resources of bioinformatics in more detail, let's get acquainted, to some extent, with practical proteomics [5].

The main task of proteomics is detecting a mechanism of a relationship of multiple proteins and peptides in a single organism. What is the practical significance of this tremendous and expensive work? It is obvious that mainly pharmacists and medical practitioners are interested in results of this work because a close relationship between changes in the protein composition and a human disease is often traced. Thus, new data in proteomics will be used (and have been already used) for quick development of new drugs and methods for curing diseases, with which medicine has been fighting for centuries. At present, 95% of all pharmacological preparations affect proteins. Proteomics with its systematic approach can help identify and assess the significance of emergence of new proteins much more effectively, which in turn, will accelerate the development of new diagnostic tests and therapeutic preparations.

The proteomic investigations were applied in practice for the first time much earlier than the term «proteomics» appeared, already at the beginning of the 20<sup>th</sup> century, when the role of insulin in the development of such serious disease as diabetes was discovered. The development of the insulin preparations saved the lives of millions of people.

Nowadays, proteomics, along with genomics and bioinformatics, is oriented at creation of new drugs, which molecular targets will be various proteins. A process of finding new targets for drug action is solved using bioinformatics, and the object of the analysis is a genome. However, after the genome analysis, it is necessary to obtain an evidence

экспрессируется и находится в клетке в рабочем состоянии. Эту задачу решает протеомика. Таким образом, выявляется молекулярная генетическая мишень для лекарства.

Следует отметить, что протеомика может и сама по себе решать проблему нахождения мишени. Если получить протеомные карты нормальных и патологических тканей, то по различиям в них можно установить, какие белки важны для развития того или иного патологического состояния, и выбрать их в качестве мишеней или использовать эти знания для диагностики. Можно предположить, что в будущем к обычному анализу крови добавится создание протеомных карт крови. Для этого в поликлиниках необходимо будет использовать специальное оборудование, с помощью которого у пациентов периодически будут брать кровь. При возникновении болезненного состояния протеомную карту больного человека нужно будет всего лишь сравнить с его же протеомной картой, но составленной в то время, когда он был здоров, и можно будет выявить произошедшие изменения в белковом составе крови и определить причину заболевания. Подобное сравнение протеомов опухолевых и нормальных клеток, клеток до и после воздействия определенных факторов (например, физических или химических), использование биологических жидкостей в диагностических целях — все это представляет огромный интерес и открывает совершенно новые перспективы для медицины, ветеринарии, фармакологии, пищевой промышленности и других прикладных областей [6, 7]. Применение протеомных технологий в лабораторной практике пищевых направлений нашло свое место сравнительно недавно. Поэтому впереди предстоит огромная и интересная работа.

### Материалы и методы

Для более полного понимания применения ресурсов биоинформатики рассмотрим общий алгоритм исследования протеомного профиля белков мяса.

Типичная последовательность операций при протеомных исследованиях такова:

- отбор образца (клетки, ткань, биологическая жидкость),
- приготовление образца, лизис клеток, экстракция белков,
- изоэлектрофокусировка, электрофорез в 1-м направлении,
- электрофорез в 2-м направлении, полиакриламидный гель, додецилсульфат натрия,
- проявление белковых пятен на геле,
- анализ двумерной электрофореграммы (количество пятен, их расположение),
- выделение участков геля, содержащих индивидуальные белковые пятна,
- расщепление индивидуальных белков трипсином прямо в геле,

that this protein is intensively expressed and presents in a cell in a working condition. This task is solved by proteomics. In this way, the molecular genetic target for a drug is revealed.

It is worth noting that proteomics per se can solve the problem of target detection. If one obtains the proteomic maps of normal and pathological tissues, then it will be possible to detect which proteins are important for developing one or another pathological condition and select them as targets or use this knowledge for diagnostics. We can suggest that, in the future, the conventional blood analysis will be complemented with blood proteomic maps. To this end, it will be necessary to use in clinics specific equipment for periodical blood sampling from patients. At disease onset, proteomic maps of patients will be compared with their proteomic maps when they were healthy, and it will be possible to reveal changes in the blood protein composition and detect a cause of a disease. A similar comparison of proteomes of malignant and normal cells, cells before and after exposure to specific factors (for instance, physical or chemical) and the use of biological fluids with the diagnostic purposes are of utmost interest and open completely new prospects for medicine, veterinary medicine, pharmacology, food industry and other applied fields [6, 7]. The application of proteomic technologies in the laboratory practice of food directions has found its place comparatively recently. Thus, a tremendous and interesting work is ahead.

### Materials and methods

For more thorough understanding of the use of bioinformatics resources, let's examine the general algorithm for studying meat protein proteomic profile.

The typical workflow in the proteomic investigations consists of the following:

- Sampling (cell, tissue, biological fluid),
- Sample preparation, cell lysis, protein extraction,
- Isoelectrofocusing, electrophoresis in the first dimension,
- Electrophoresis in the second dimension, polyacrylamide gel, sodium dodecyl sulfate,
- manifestation of protein spots in a gel,
- analysis of a two-dimensional gel electropherogram (number of spots, their location),
- excision of the gel areas containing individual protein spots,
- tryptic digestion of individual proteins directly in a gel,

- масс-спектрометрический анализ:
  - определение аминокислотных последовательностей фрагментов индивидуальных белков,
  - идентификация каждого белка и измерение его концентрации, документирование, обработка результатов.
  - интерпретация полученных данных с помощью биоинформатики, анализ баз данных, в итоге, получение дифференциального профиля белков.

Результатом масс-спектрометрической идентификации белковых молекул является список потенциальных белков-кандидатов, ранжированных в соответствии со значением показателя Score (показатель соответствия или «счет очков»), рассчитанного для каждого потенциального кандидата. Результат считается достоверным, если значение данного показателя превышает 200. 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.).

В качестве основных протеомных технологий применяют двумерный электрофорез (2-D) по O'Farrell с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE) или иммобилиновом (IPG-PAGE) градиентах pH; последующую детекцию белков проводят окрашиванием Кумасси R-250 и азотнокислым серебром [8, 12].

Схематично это можно представить следующим образом (Рисунок 1).

Идентификацию белковых фракций на двумерных электрофореграммах (ДЭ) осуществляют после трипсинолиза методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI- времяпролетном масс-спектрометре с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–1000 Да с калибровкой их по известным пикам аутолиза трипсина (Рисунок 2).

После идентификации на масс-спектрометре искомого белка (маркера), на завершающем этапе главную роль играет правильная интерпретация полученных масс-спектров, по имеющимся базам данных (пример Рисунок 3), с подтверждающими или опровергающими догадками о полученном результате.

### Обсуждение

Рассмотрим пример идентификации кандидатного белка (искомого/маркера) лошади по международной базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Суммарно в ходе исследования на двумерных электрофореграммах белков длинной мышцы лошади было идентифицировано 61 фракция (Рисунок 4).

- mass spectrometric analysis,
  - detection of amino acid sequences of the individual protein fragments,
  - identification of each protein and measurement of its concentration, documentation and data processing.
  - interpretation of the obtained data using bioinformatics, analysis of databases, and, finally, generation of distinct protein profiles.

The result of the mass-spectrometric identification of protein molecules is a list of potential candidate proteins ranged according to a Score value (an indicator of matches or scoring), calculated for each potential candidate. The result is considered significant if the value of this indicator is higher than 200. For every candidate, a species origin is also indicated, which can be decisive in interpretation, and references to the personal pages (the final result), which contain comprehensive information about a potential protein (its molecular weight and isoelectric points, decryption of the tryptic peptide sequences, the number of matches, % of complete coverage of amino acid sequence of a protein by peptides etc.)

The two-dimensional electrophoresis (2DE) by O'Farrell with isoelectrofocusing in ampholine (IEF-PAGE) or immobiline (IPG-PAGE) pH gradients is used as the main proteomic technology; the following protein detection is carried out by staining with Coomassie R-250 and silver nitrate [8, 12].

This can be presented schematically as follows (Fig. 1):

Identification of protein fractions on two-dimensional electrophoregrams (2DE) is performed after tryptic proteolysis by MALDI-TOF MS and MS/MS mass-spectrometry using MALDI- TOF mass-spectrometer with UV-laser (336 nm) in the positive ion mode and a mass range of 500–1000 Da with their calibration according to the known trypsin autolysis peaks (Fig. 2).

At the final stage, after identification on a mass-spectrometer of a target protein (marker), the main role plays correct interpretation of the obtained mass-spectra using available databases (Fig. 3, an example) with confirming or refuting suggestions about the obtained result.

### Discussion

Let's consider an example of identification of an equine candidate protein (target/marker) using the International Base of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

In total, 61 fractions were identified on the two-dimensional electrophoregrams of proteins from the equine longissimus muscle (Fig. 4).

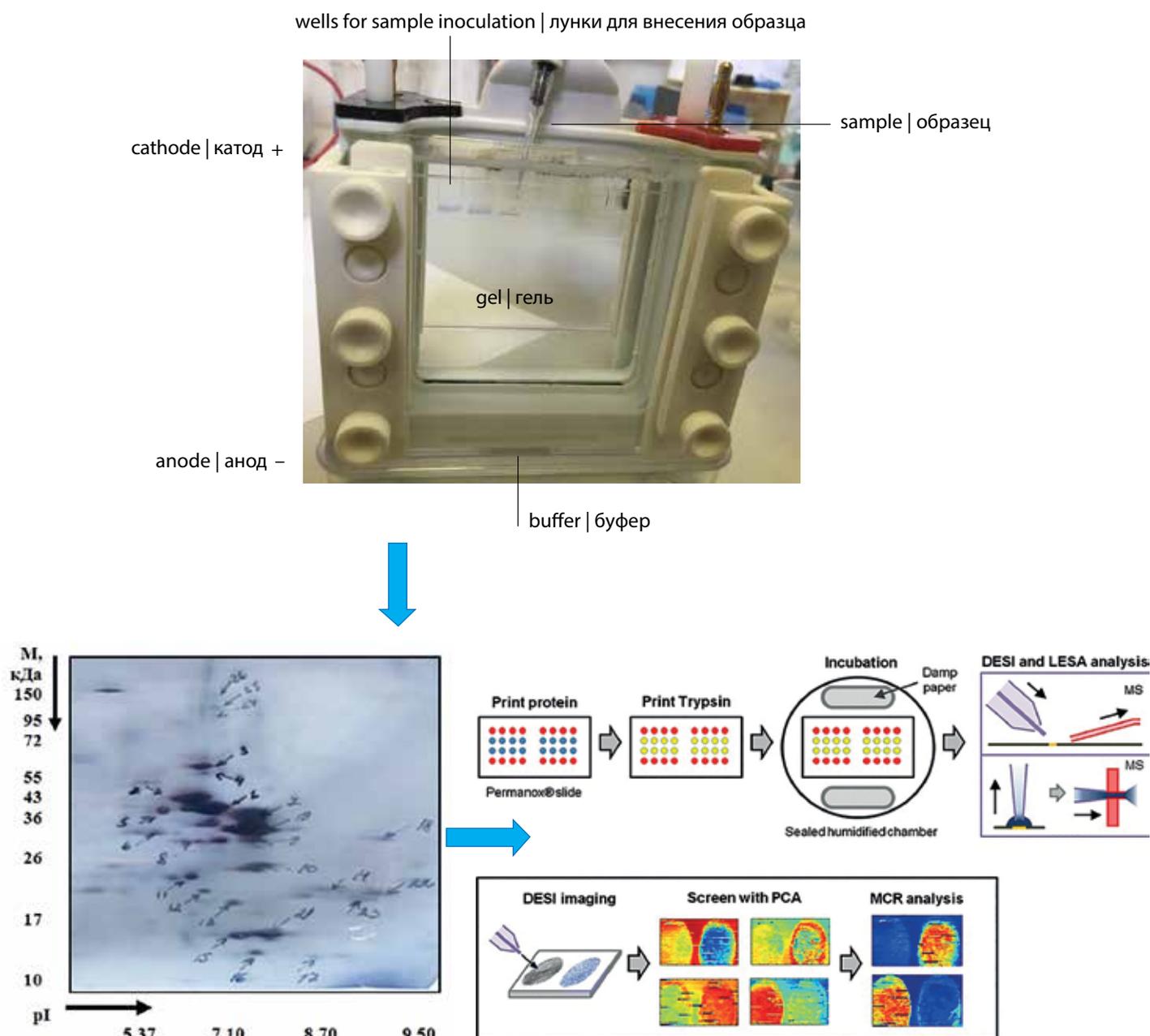


Figure 1. Scheme of 2-D electrophoresis with the following identification of protein spectra using time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF)

Рис. 1. Схема проведения 2-D электрофореза с последующей идентификацией спектров белков при помощи метода время-пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF)

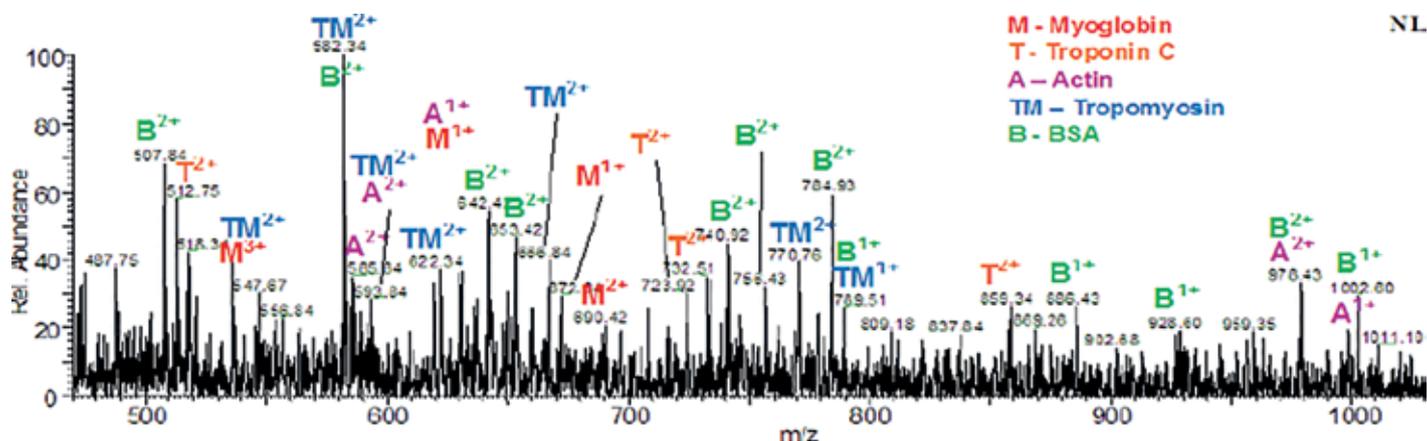


Figure 2. Mass-spectrometric identification of the selected peptide (marker/target)

Рис. 2. Масс-спектрометрическая идентификация выбранного пептида (маркера/искомого)

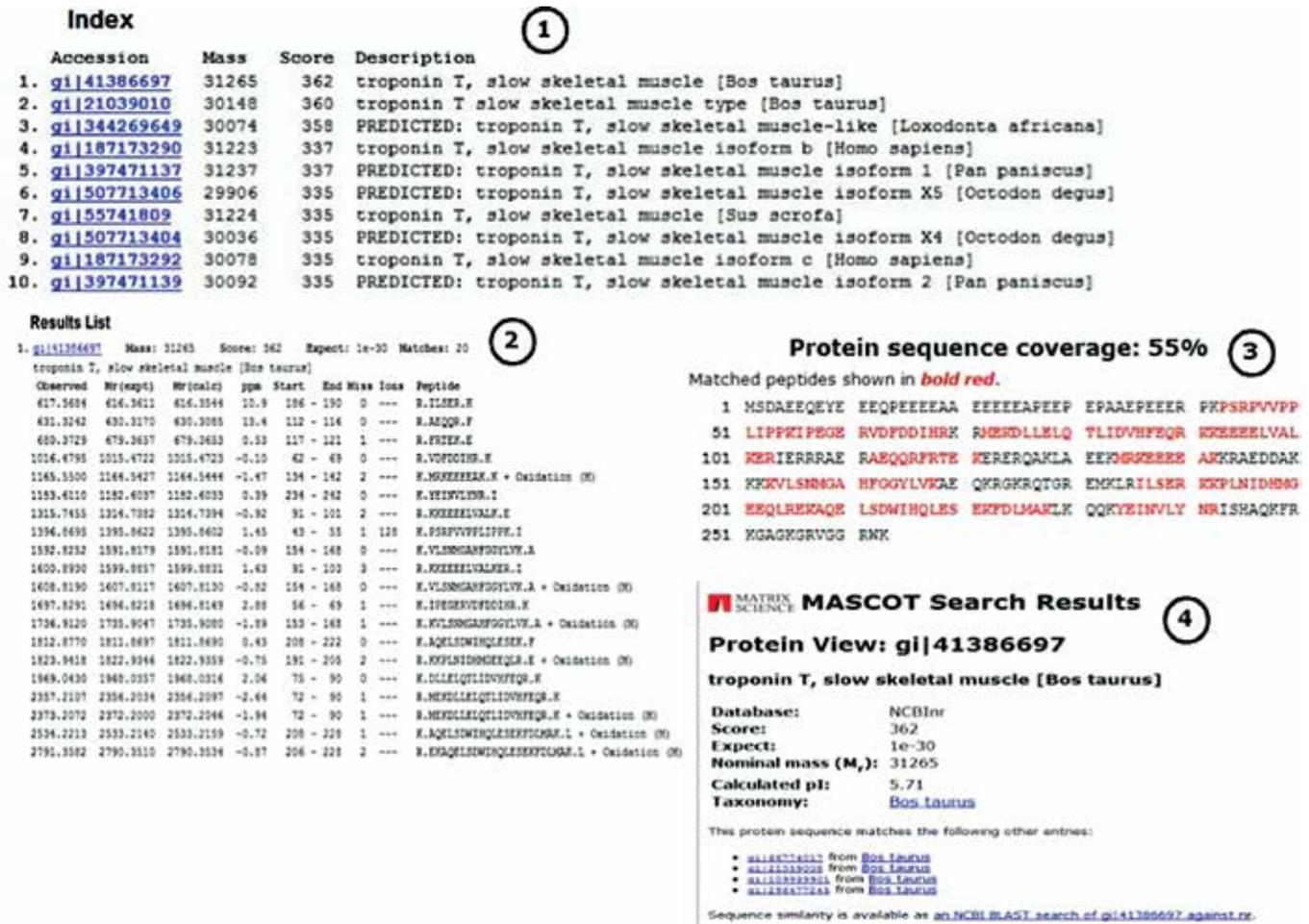


Figure 3. Identification of a protein using the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA) (Mascot software, Matrix Science, USA)

(1 — a list of potential candidate proteins; 2 — decryption of tryptic peptide sequences with determination of the number of matches; 3 — distribution of the revealed peptides on an amino acid sequence; 4—final result).

Рис.3. Идентификация белка по международной базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (программа Mascot«MatrixScience», США)

(1 — список потенциальных белков-кандидатов; 2 — расшифровка триптических пептидов с определением числа совпадений; 3 — распределение выявленных пептидов по аминокислотной последовательности; 4—итоговый результат). Не могу убрать этот рисунок он очень наглядно отображает работу по базе данных-как одним из ключевых элементов биоинформатики.

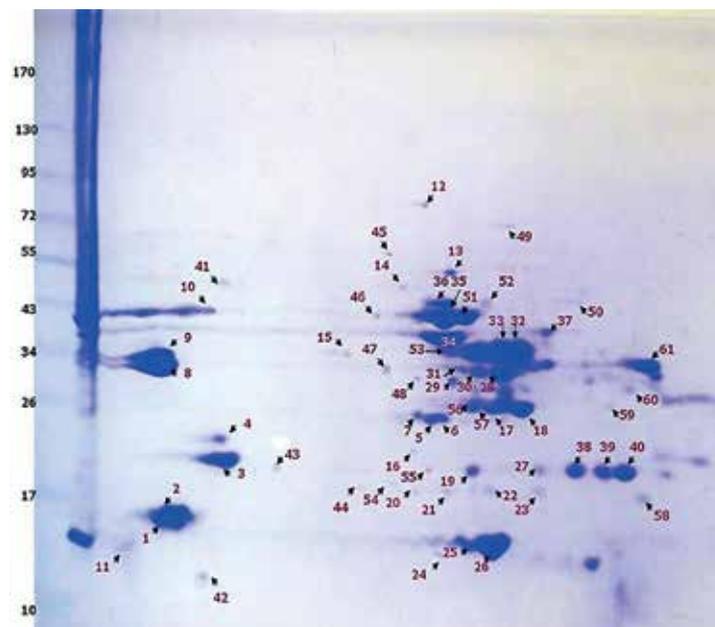


Figure 4. The results of the proteomic analysis of total proteins from equine *m. Longissimus dorsi* (*Equus caballus*)

Рис.4. Результаты протеомного анализа суммарных белков *m. Longissimus dorsi* лошади (*Equus caballus*)

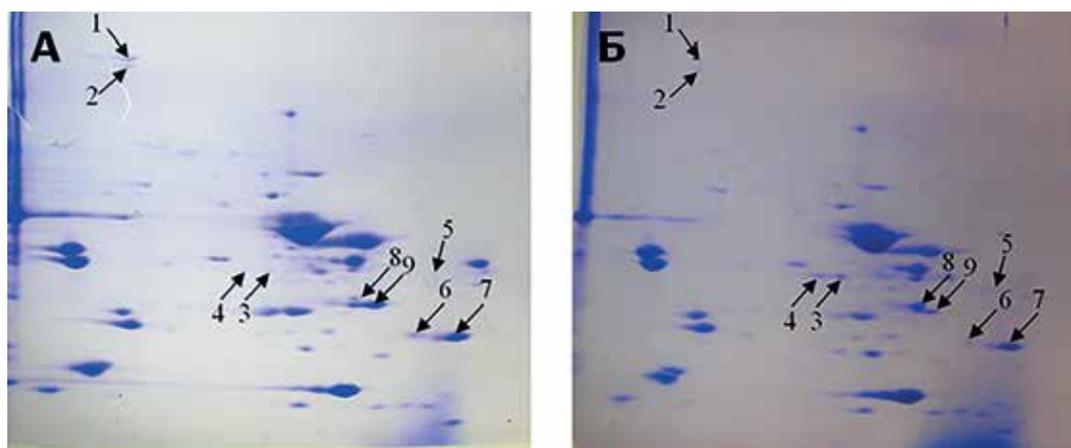


Figure 5. Proteomic profiles of *m. Triceps brachii* (A) and *m. Biceps femoris* (B) of *Equus caballus*

Рис. 5. Протеомные профили *m. Triceps brachii* (A) и *m. Biceps femoris* (B) *Equus caballus*

Различные виды скелетных мышц имеют определенные особенности в белковом составе. Наиболее полно исследования, затрагивающие данный аспект, представлены по тканям человека, а что касается тканей с/х животных, информации явно недостаточно [8]. С целью поиска данных особенностей, было проведено сравнение белкового состава трехглавой мышцы плеча (*m. Triceps brachii*) и двуглавой мышцы бедра (*m. Biceps femoris*) домашней лошади. В результате найден ряд количественных отличий (Рисунок 5).

Результаты идентификации показали (Табл. 1), что основные различия наблюдались по таким белковым

Different types of skeletal muscles have specific characteristics of the protein composition. The most comprehensive investigations concerning this aspect are presented for human tissues; as for the tissues of farm animals, the information is clearly insufficient [8]. To establish these specific characteristics, the protein composition of the triceps brachii muscle (*m. Triceps brachii*) and biceps femoris muscle (*m. Biceps femoris*) of domestic horses was compared. As a result, several quantitative differences were found (Fig. 5).

The results of identification (Table 1) showed that the main differences were observed for such protein fractions

Table 1. Results of the mass-spectrometric identification (MALDI-TOF MS and MS/MS) of protein fractions that differed in quantity in *m. Triceps brachii* and *m. Biceps femoris* (*Equus caballus*)

Таблица 1. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) белковых фракций, отличающихся по количеству в *m. Triceps brachii* и *m. Biceps femoris* (*Equus caballus*)

№	Protein; certain synonyms, ( <i>gene symbol</i> )   Наименование белка; некоторые синонимы, ( <i>символ гена</i> )	Numbers in Protein NCBI*   Номера в Protein NCBI*	S / M/ C **	Мм/pI (exper.)   Мм/pI (эксп.)	Мм/pI (calcul.)***   Мм/pI (расчет.)***
1	C-terminal fragment of myosin-1 ( <i>MYH1</i> ), [ <i>Equus caballus</i> ] (563–1938)   C — концевой фрагмент myosin-1 ( <i>MYH1</i> ) [ <i>Equus caballus</i> ] (563–1938)	126352470	402/81/35	130,0/5,10	222,0/5,59
2	myosin-7 ( <i>MYH7</i> ) [ <i>Equus caballus</i> ]	1263523320	389/77/40	127,0/5,05	223,0/5,57
3	troponin T homolog, slow skeletal muscle isoform X1 ( <i>TNNT1</i> ) [ <i>Sus scrofa</i> ]   Гомолог troponin T, slow skeletal muscle isoform X1 ( <i>TNNT1</i> ) [ <i>Sus scrofa</i> ]	545832797	254/48/64	29,0/6,70	32,5/5,54
4	troponin T homolog, slow skeletal muscle isoform X1 ( <i>TNNT1</i> ) [ <i>Sus scrofa</i> ]   Гомолог troponin T, slow skeletal muscle isoform X1 ( <i>TNNT1</i> ) [ <i>Sus scrofa</i> ]	545832797	336/50/66	29,0/6,50	32,5/5,54
5	myozenin-1 ( <i>MYOZ1</i> ) [ <i>Equus caballus</i> ]	14968997	203/23/62	32,0/8,30	31,7/7,85
6	troponin I homolog, fast skeletal muscle ( <i>TNNI2</i> ) [ <i>Equus asinus</i> ]   гомолог troponin I, fast skeletal muscle ( <i>TNNI2</i> ) [ <i>Equus asinus</i> ]	958805655	478/63/86	40,0/8,10	21,4/8,86
7	troponin I homolog, fast skeletal muscle ( <i>TNNI2</i> ) [ <i>Equus asinus</i> ]   гомолог troponin I, fast skeletal muscle ( <i>TNNI2</i> ) [ <i>Equus asinus</i> ]	958805655	435/56/88	40,0/8,60	21,4/8,86
8	carbonic anhydrase 3	255653028	151/15/58	29,0/7,70	29,5/7,70
9	phosphoglycerate mutase 2 isoform X1	149704608	209/21/70	28,5/7,90	28,6/8,86

\* Предсказаны по транскриптам или генам.

\*\* S / M/ C — традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score — показатель соответствия или «счет очков»;

Matchpeptides — количество совпавших пептидов;  
Coverage — % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

\*\*\* расчет показателей Мм/pI сделан по предсказанной аминокислотной последовательности по записи, удаленной из последней версии базы данных Protein NCBI.

\* Predicted on the basis of transcripts or genes.

\*\* S / M/ C — traditional indices for identification used in English literature:

Score — an indicator of matches or scoring;

Matchpeptides — The number of peptide spectrum matches;

Coverage — The percentage of the complete protein sequence covered by identified peptides.

\*\*\* Мм/pI were calculated on the basis of the predicted amino acid sequence according to the entry deleted in the latest version of the NCBI Protein database.

фракциям, как тяжелые цепи миозина (изменение соотношения электрофоретических изоформ № 1 и 2), количество медленного (№ 3 и 4) скелетномышечного тропонина Т, при том, что фракции быстрого скелетномышечного тропонина I (№ 6 и 7) не меняли своего соотношения. Также в двуглавой мышце бедра было отмечено значительное увеличение количества миозина-1 (№ 5), связывающего саркомерные белки в области Z-дисков и очень сильно менялось соотношение мышечной карбоангидразы и фосфолипазы (№ 8 и 9).

#### *Построение двумерных карт скелетной мышцы лошади и формирование информационного модуля «Белки скелетной мышцы лошади»*

Для построения двумерных карт белков скелетных мышц лошади было использованы электрофореграммы, окрашены как Кумасси R-250, так и нитратом серебра. Распределение белковых фракций на каждой из полученных двумерных электрофореграмм документировали в виде соответствующего изображения. Каждое изображение регистрировалось и сохранялось в виде графического файла формата \*.tif. Полные изображения ДЭ и (в некоторых случаях) их отдельных участков получали по результатам сканирования и/или по данным цифровой фотографии.

Построенные карты, на которые были нанесены электронные «кнопки» для каждой идентифицированной белковой фракции, составили первый уровень для представления всех собранных материалов о белках скелетных мышц лошади и верблюда.

В соответствии с программой формирования модулей в БД для каждой электронной «кнопки» было сформировано на втором информационном уровне 21 поле и на третьем уровне — 27 полей для внесения данных, характеризующих идентифицированный белок.

На Рисунке 6 в качестве примера представлен информационный модуль «Белки скелетной мышцы лошади (*Equus caballus*)», состоящий из 3 основных уровней с графой авторской принадлежности полученных данных.

#### *Количественный анализ отдельных белковых фракций*

Для проведения количественного анализа отдельных белковых фракций на ДЭ сначала создавали полные цифровые изображения отобранных для сравнения двумерных электрофореграмм (или их отдельных фрагментов) с помощью сканера Epson Expression 1680 (или Perfection 2450 Photo). Сканирование проводилось во влажном состоянии. Далее полученные цифровые изображения редактировали в графическом редакторе из специализированного пакета программ Melanie ImageMaster, версий 6 и 7 («GeneBio», Швейцария).

as heavy myosin chains (changes in the ratio of the electrophoretic isoforms No.1 and 2), the quantity of slow (No. 3 and 4) skeletal muscle troponin T, while the fractions of the fast skeletal muscle troponin I (No. 6 and 7) did not change their ratio. In addition, it was found that the quantity of myozenin-1 (No.5), which links the sarcomeric proteins in the area of Z-disks, significantly increased and the ratio of muscle carbohydrazase and phosphoglycerate mutase (No. 8 and 9) highly changed.

#### *Construction of two-dimensional maps of the equine skeletal muscle and creation of the information module «Proteins of the equine skeletal muscle»*

To construct two-dimensional maps of the equine skeletal muscles, the electrophoregrams stained both with Coomassie R-250 and silver nitrate were used. Distribution of the protein fractions on each of the obtained two-dimensional electrophoregrams were documented as a corresponding image. Each image was registered and saved as an image file in the TIFF format.

The complete DE images and in some cases their individual areas were obtained on the basis of the scanning results and/or the digital photography data.

The constructed maps, on which the electronic «buttons» for each identified protein fraction were applied, comprised the first level for presentation of all collected information about the equine and camel skeletal muscle proteins.

According to the program of module creation, in the database, 21 fields and 27 fields were formed for each electronic «button» at the second and third information levels, respectively, to entry the data that characterized an identified protein.

As an example, Fig. 6 presents the information module «Proteins of the equine skeletal muscle (*Equus caballus*)», which consists of 3 main levels with indication of the authorship of the obtained data.

#### *Quantitative analysis of individual protein fractions*

For quantitative analysis of the individual protein fractions on DE, the complete digital images of the selected two-dimensional electoforegrams (or their individual fragments) were created using Epson Expression 1680 (or Perfection 2450 Photo) scanner. Scanning was carried out in a wet condition. Then, the obtained digital images were edited in the graphical editor from the specialized software package Melanie ImageMaster, versions 6 and 7 (GeneBio, Switzerland).

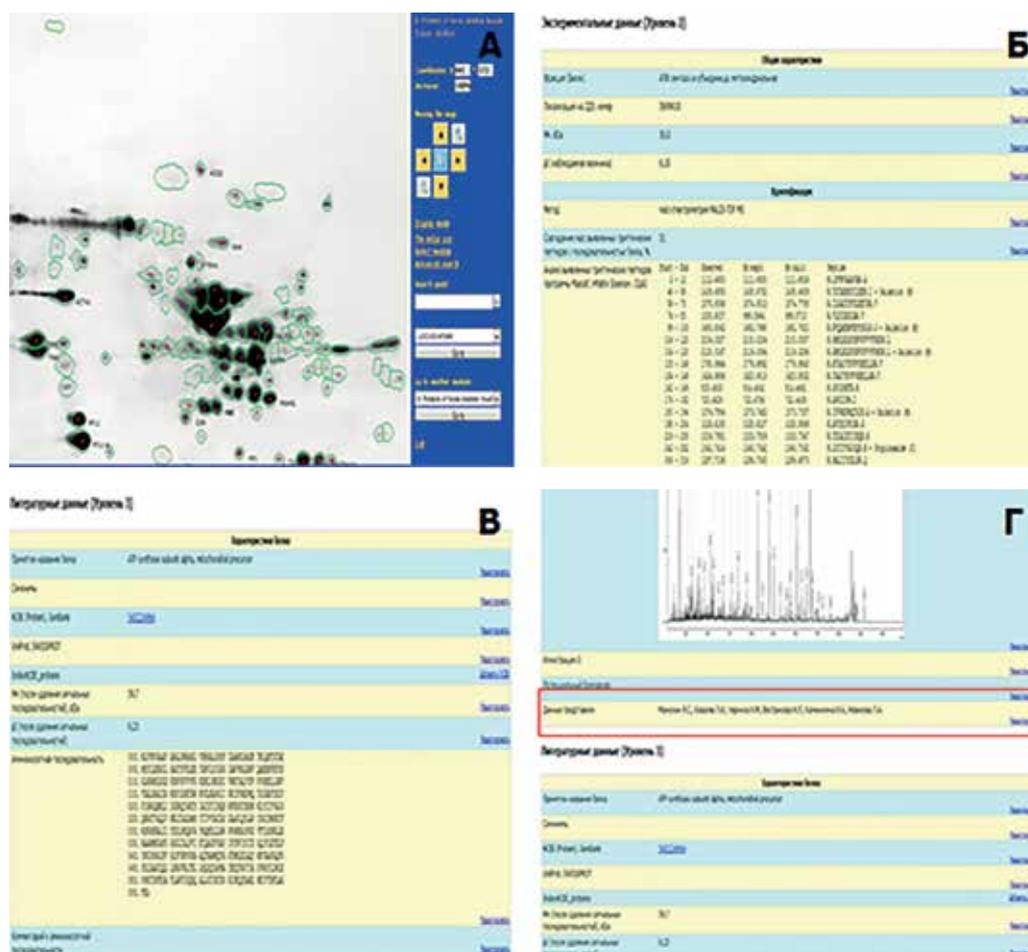


Figure 6. Information module «Proteins of the equine skeletal muscle»: А — level 1; Б — level 2; В — level 3; Г –author’s line

Рис. 6. Информационный модуль «Белки скелетной мышцы лошади»: А — 1 уровень; Б — 2 уровень; В — 3 уровень; Г — авторская графа

Дальнейшая процедура проходит в несколько этапов.

На первом этапе, проводился автоматический программный анализ гелей, в результате которого программа находит пятна и придает очертание по их окрашенной площади. Промежуточный результат такого компьютерного анализа представлен на (Рисунок 7).

The following procedure is performed in several stages.

At the first stage, an automatic program analysis of gels was carried out, which resulted in detecting spots by the program and drawing their contours according to the stained area. An intermediate result of this computer analyses is presented in Fig. 7.

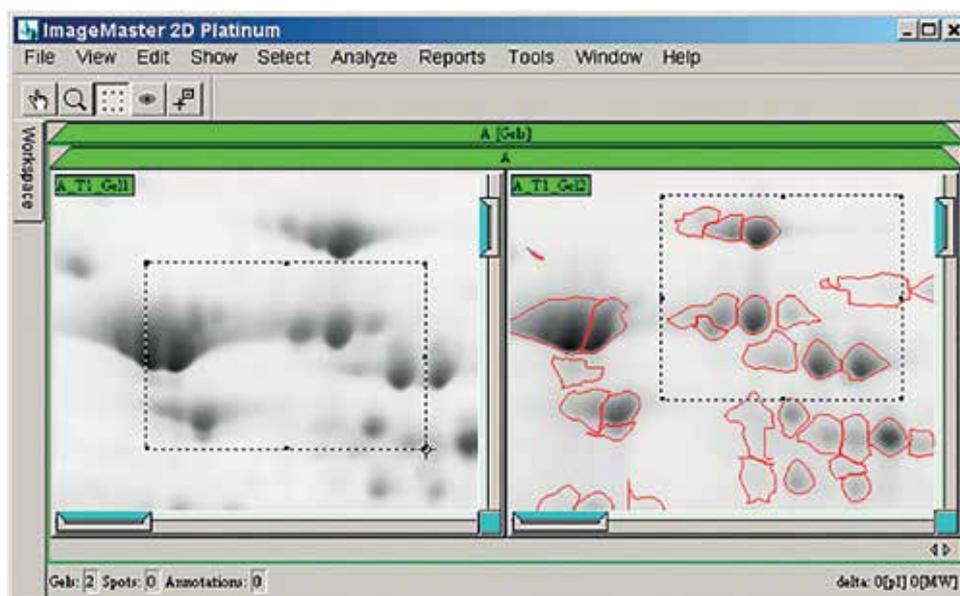


Figure 7. Automatic spot detection in the gel

Рис. 7. Автоматическое определение пятен на геле

Поскольку белковые фракции пятна имеют разную степень окраски, и могут сливаться с фоном, в программе задаются 3 параметра («Smooth», «Saliency», «Min Area») для выявления («identification») белковых фракций (пятен, «spots»). Окно настройки параметров автоматического обнаружения пятен и дополнительное окно «cursor information» показаны на Рисунке 8.

Параметр «Smooth», используя алгоритм диффузного сглаживания, обеспечивает идентификацию наиболее сильно выраженных пятен, а также четкость определения края пятна. Для того чтобы отделить слабо окрашенные пятна от фона и шума изменяется параметр «Saliency».

Изменяя данный параметр, можно обеспечить фильтрацию по интенсивности окрашивания пятен. Для точного определения интенсивности, необходимо вызвать дополнительное окно cursor information, после чего курсор мышки наводится на слабоокрашенное пятно и высвечивается его численный замер, который показывает разницу между фоном и интенсивно окрашенными пятнами.

Таким образом, задается промежуточное значение интенсивности пятен (между серым фоном и черными пятнами) благодаря которому будут учитываться все пятна, интенсивность которых выше этого порога.

Третий параметр «Min Area» задает минимальную площадь пятна, все пятна обладающей площадью ниже этого значения не будут идентифицированы. Несмотря на проведенную предварительную обработку изображений, программа иногда в отдельных участках изображения давала не совсем точные очертания пятна. Для устранения подобных недостатков форма отдельных пятен дополнительно корректировалась вручную.

As protein fractions of a spot have different degrees of staining and can blend into the background, the program sets 3 parameters (Smooth, Saliency, Min Area) to identify protein fractions (spots).

The window for adjusting parameters of spot automatic detection and the additional window «Cursor Information» are shown in Fig. 8.

Smooth parameter uses a smooth-by-diffusion algorithm and enables identification of the most highly pronounced spots as well as clear detection of spot edge.

Saliency parameter is used to separate weakly stained spots from the background and noise. By changing this parameter, it is possible to ensure filtration by the spot staining intensity. For precise detection of the intensity, it is necessary to open Cursor Information; after that, the cursor is moved to a weakly stained spot and its values are displayed, demonstrating the difference between the background and intensively stained spots.

Thus, an intermediate value of the spot intensity (between the grey background and black spots) is given, due to which all spots with the intensity higher than this threshold will be taken into account.

The third parameter «Min Area» sets the minimal spot area; all spots with areas lower than this value will not be identified. Despite the performed preliminary processing of images, the program sometimes gave not exactly precise spot contours in the individual areas. To eliminate such drawbacks, a shape of individual spots was additionally corrected by hand.

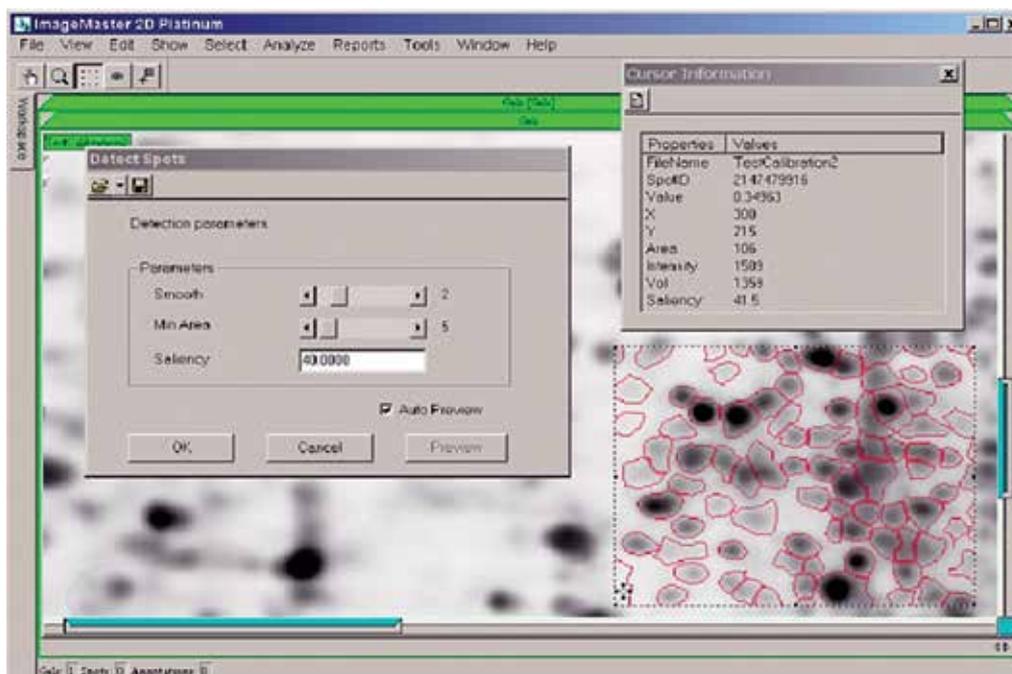


Figure 8. The window for adjusting parameters of spot automatic detection and the additional window «Cursor Information»  
Рис. 8. Окно настройки параметров автоматического обнаружения пятен и дополнительное окно «cursor information»

Использование дополнительной ручной обработки отдельных участков изображений приводило к тому, что при построении общего синтетического изображения (карты) сильно увеличивался итоговый размер, что приходилось учитывать при последующем анализе.

Далее на втором этапе обработки изображений осуществляется сбор сведений о пятнах и построение трехмерных моделей на их основе. Анализ пятен проводился ещё по трем основным параметрам: интенсивность, площадь и объем пятна.

Интенсивность — показывает степень окрашивания пятна по сравнению с фоном; при этом берется значение наиболее сильно окрашенных пикселей самого пятна и наиболее светлой области ближайшего фона, окружающего пятно.

Площадь пятна — данный параметр высчитывает по среднему значению интенсивности окрашивания. Поскольку точно определить границы пятна в автоматическом режиме часто затруднительно, то пятнам присваивается несколько большая площадь, и значение показателя берется из расчета 75% от интенсивности пятна. Площадь выражается в  $\text{мм}^2$ .

Объем пятна — вычисляется из показателя площадь пятна, рассчитываемого строго по линии обводки пятна.

Итоговые трехмерные модели представляют собой наборы пиков, при этом, чем больше интенсивность, тем выше пик, и тем больше концентрация белка в данной фракции. Высота пика берется из расчета 75% от интенсивности пятна.

Основные шаги в решении данной задачи показаны на Рисунок 9.

The use of additional manual processing of the individual image areas led to a significant increase in the final size when constructing the total synthetic image (map), which was necessary to take into consideration during the following analysis.

Then, at the second stage of image processing, information about spots was collected and the three-dimensional models were constructed on their base. Spot analysis was carried out also by three main parameters: the spot intensity, area and volume.

The intensity shows a degree of staining compared to the background; with that, the values of the most strongly stained pixels of a spot and the lightest area of the nearest background surrounding a spot are taken.

The area of a spot is calculated by a mean value of the staining intensity. As it is often difficult to precisely determine spot boundaries in the automatic regime, slightly larger areas are assigned to the spots and the value of the indicator is calculated as 75% of the spot intensity. The area is expressed in  $\text{mm}^2$ .

The volume of a spot is derived from a spot area calculated strictly along the outline of a spot.

The final three-dimensional models represent sets of peaks; with that, the higher intensity, the higher peak and the larger the protein concentration in this fraction. The height of a peak is calculated as 75% of the spot intensity.

The main steps in solving this task are presented in Fig. 9.

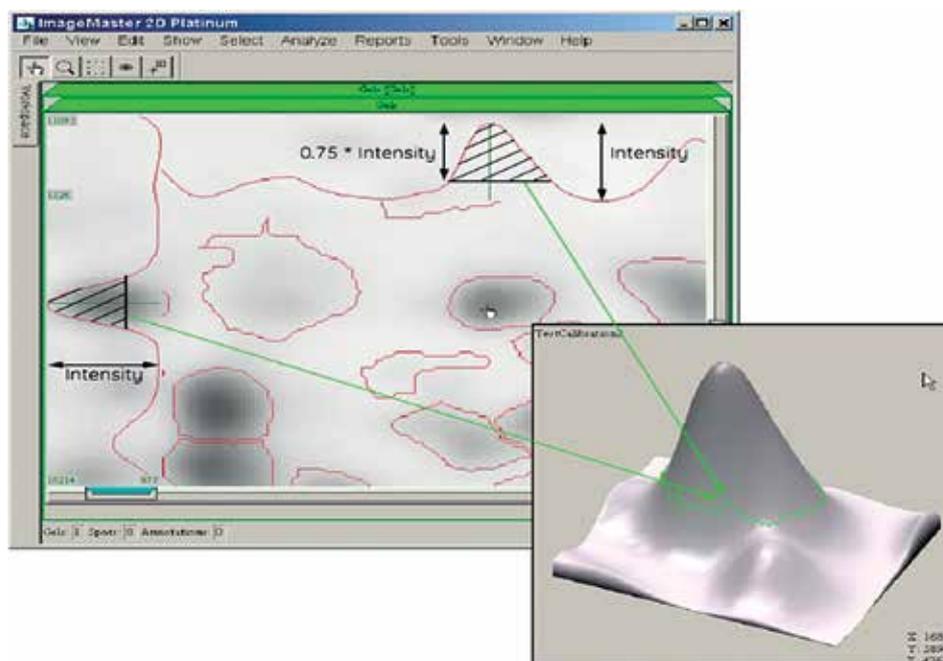


Figure 9. The main steps in the task of constructing a three-dimensional model of an image area under investigation (the arrows show: a difference in calculation of the parameters of intensity, area and volume ( $100 \times 75$ ), three-dimensional spot model is presented as a peak, which reflects the shape and volume of a spot).

Рис. 9. Основные шаги в решении задачи построения трехмерной модели исследуемого участка изображения (стрелками указаны: разница при расчетах параметров интенсивности, площади и объема ( $100 \times 75$ ), трехмерная модель пятна, представлена в виде пика, который отображает форму и объем пятна).

Таким образом, в принципе комплексная компьютерная денситометрия по ряду видоспецифичных белков-маркеров может существенно увеличить точность определения видов исходного мясного сырья в конечном продукте.

К настоящему времени результаты, выполненных протеомных исследований мышц сельскохозяйственных животных, открыли путь к созданию высокочувствительных технологий контроля качества мясных продуктов питания на основе анализов видоспецифических изоформ ряда мышечных белков.

Для развития биохимии белков в начале 21-го века принципиальное значение приобрело широкое применение протеомных биоинформационных технологий [9, 10]. Накапливающиеся результаты, представляющие собой совокупности взаимосвязанных сведений, подлежащих совместной обработке, рассматриваются как соответствующие информационные массивы, на основе которых формируются различные общие и специализированные базы данных, размещаемые в сети Интернет. Среди них надо особо отметить в базе данных UniProt информационный ресурс, названный «Complete proteome of Homo sapiens», который к середине 2012 года включал более 70 000 аннотаций, однако из них только 25 000 аннотаций (35,2%) представляли результаты прямых исследований соответствующего белка. Таким образом, очевидно, что большая часть (64,8%) созданных аннотаций нуждается в дополнительных экспериментальных материалах, при получении которых решающую роль могут сыграть протеомные технологии и дальнейшее развитие информационных ресурсов, что свидетельствует о высокой актуальности подобных исследований [11].

Наряду с изучением разных аспектов белкового полиморфизма и других фундаментальных проблем биохимии белков мышечных органов протеомные технологии находят все более широкое применение в разработках биомедицинских проблем, ориентированных на решение многих прикладных задач — от выявления потенциальных диагностических белковых биомаркеров, мишеней фармакологических воздействий [9] до создания методов контроля за качеством различных пищевых продуктов, изготавливаемых из мышечных тканей животных [13].

При исследовании протеомных профилей белков, многие ученые останавливаются на этапе получения двумерных электрофореграмм, не имея порой даже представления о дальнейших перспективах использования современных инструментальных и биоинформационных ресурсов, позволяющих подтвердить или опровергнуть их гипотезы, а порой просто идентифицировать. В данной работе представлена цепочка действий, позволяющих пройти путь от получения профиля белков на геле, до конкретной интерпретации полученного результата.

Thus, as a principle, the complex computer densitometry by a range of species-specific marker proteins can significantly increase a precision of species detection of initial meat raw material in a final product.

Up to date, the results of the performed proteomic studies of muscles from farm animals opened a way to creation of highly sensitive technologies for quality control of meat products based on the species-specific isoforms of several meat proteins.

A wide use of proteomic bioinformation technologies took on great significance for development of protein biochemistry at the beginning of the 21<sup>st</sup> century [9, 10]. The accumulated results, which present a complex of interrelated data subjected to integrated processing, are regarded as corresponding information arrays, on which basis various general and specialized databases are formed and placed on the Internet. Among them, it is necessary to particularly note an information resource in the database UniProt called «Complete proteome of Homo sapiens», which included more than 70 000 summaries up to the middle of 2012; however, only 25 000 of the summaries (35.2%) represented the results of the direct studies of the corresponding proteins. Therefore, it is evident that the majority (64.8%) of the developed summaries require additional experimental data; with that, the proteomic technologies and further development of information resources can play an important role in acquisition of these data suggesting high topicality of such studies [11].

In addition to studying different aspects of the protein polymorphism and other fundamental problems of protein biochemistry of muscular organs, the proteomic technologies are finding ever-widening application in developments in the field of biomedical problems directed at solving many applied tasks from revealing potential diagnostic protein biomarkers, targets for pharmacological interventions [9] to developing methods of quality control for various food products produced from animal muscle tissues [13].

When studying protein proteomic profiles, many scientists stop at the stage of obtaining two-dimensional electrophoregrams without any consideration of the following prospects of using modern instrumental and bioinformation resources that make it possible to confirm or refute their hypotheses and sometimes just identify. This paper presents a workflow, which enables going from obtaining protein profiles in a gel to the concrete interpretation of the obtained result.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Электронный ресурс. URL: [http://web.expasy.org/docs/swiss-prot\\_guideline.html/](http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html/) UniProtKB/Swiss-Prot/SIB Швейцарский Институт биоинформатики. (дата обращения: 26.10.2016).
2. Замятнин, А.А. Фрагменты пищевых белков — регуляторные олигопептиды / А.А. Замятнин, О.Л. Воронина // Биохимия. — 2012. — Т. 77. — № 5. — С. 622–632.
3. Замятнин, А.А. Блестящий мир белков и пептидов / А.А. Замятнин // Биология. — 2002. — № 25. — С. 8–13.
4. Протеомика — шаг, следующий за геномикой / Антон Иванов, STRF.ru Электронный ресурс. URL: [http://old.strf.ru/material.aspx?CatalogId=352&d\\_no=11979#.WFIn3IOLTIU](http://old.strf.ru/material.aspx?CatalogId=352&d_no=11979#.WFIn3IOLTIU) (дата обращения: 26.10.2016)
5. Sun, H. Proteomic and bioinformatic analysis of differentially expressed proteins in denervated skeletal muscle / H. Sun, J. Qiu, Y. Chen et al. // *Int. J. Mol. Med.* — 2014. — V. 33. — № 6. — P. 1586–1596.
6. Weckwerth, W. Metabolomics: an integral technique in systems biology // *Bioanalysis.* — 2010. — V. 2. — P. 829–836.
7. Venter, C.J. The Sequence of the Human Genome / C.J. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers et al. // *Science.* — 2001. — V. 291. — P. 1304–1351.
8. Ковалев, Л.И. Протеомное изучение белков в образцах свинины и выработанных из нее мясных продуктах / Ковалев Л.И., Шишкин С.С., Ковалева М.А., Иванов А.В., Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. // *Всё о мясе.* — 2013. — №3. — С. 32–34.
9. Novel markers for tying-up in horses by proteomics analysis of equine muscle biopsies / F.G. Bouwman, M.M van Ginneken, J.H. van der Kolk, E.C. Mariman // *Comp BiochemPhysiol Part D Genomics Proteomics.* — 2010. — V. 5 — № 2. — P. 178–183. DOI: 10.1016/j.cbd.2010.03.009.
10. Shibata, M. Differential expression of the skeletal muscle proteome in grazed cattle / M. Shibata, K. Matsumoto, M. Oe et al. // *J. anim. Sci.* — 2009. — V. 87. — № 8. — P. 2700–2708.
11. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources / N.L. Anderson, M. Polanski, R. Pieper, et al. // *Mol. Cell Proteomics.* — 2004. — V. 3. — № 4. — P. 311–326.
12. Применение протеомных технологий для анализа мышечных белков сельскохозяйственных животных, используемых в мясной промышленности (обзор) / С.С. Шишкин, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева и др. // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 2014. — № 5. — С. 453–465.
13. Shishkin S.S., Kovaleva M.A., Eryomina L.S., Lisitskaya K.V., Kovalev I.I. Proteomic Approaches for the Study of Transgelins as Tumor-associated Proteins and Potential Biomarkers. // *Current Proteomics.* — 2013. — V. 10. — № 2. — P. 165–178.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

## Принадлежность к организации

**Вострикова Наталья Леонидовна** — кандидат технических наук, заведующий лабораторией «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования», Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова.  
109316, г. Москва, ул. Талалихина д. 26  
Тел.: 8-495-676-79-81  
E-mail: [nvostrikova@list.ru](mailto:nvostrikova@list.ru)

**Чернуха Ирина Михайловна** — доктор технических наук, профессор, ведущий 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  
Телефон: раб. 8-495-676-97-18  
E-mail: [imcher@inbox.ru](mailto:imcher@inbox.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 20.12.2016

## REFERENCES

1. Electronic resource. URL: [http://web.expasy.org/docs/swiss-prot\\_guideline.html/](http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html/) UniProtKB/Swiss-Prot/SIB Swiss Institute of Bioinformatics (access date: 26.10.2016).
2. Zamyatnin, A.A. Fragments of food proteins — regulatory oligopeptides / A.A. Zamyatnin, O.L. Voronina // *Biochemistry.* — 2012. — V. 77. — № 5. — P. 622–632.
3. Zamyatnin, A.A. Brilliant world of proteins and peptides / A.A. Zamyatnin // *Biology* — 2002. — V. 25. — P. 8–13.
4. Proteomics — a step following genomics/ Anton Ivanov, STRF.ru Electronic resource. URL: [http://old.strf.ru/material.aspx?CatalogId=352&d\\_no=11979#.WFIn3IOLTIU](http://old.strf.ru/material.aspx?CatalogId=352&d_no=11979#.WFIn3IOLTIU) (access date: 26.10.2016)
5. Sun, H. Proteomic and bioinformatic analysis of differentially expressed proteins in denervated skeletal muscle / H. Sun, J. Qiu, Y. Chen et al. // *Int. J. Mol. Med.* — 2014. — V. 33. — № 6. — P. 1586–1596.
6. Weckwerth, W. Metabolomics: an integral technique in systems biology // *Bioanalysis.* — 2010. — V. 2. — P. 829–836.
7. Venter, C.J. The Sequence of the Human Genome / C.J. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers et al. // *Science.* — 2001. — V. 291. — P. 1304–1351.
8. Kovalev, L.I. Proteomic study of proteins in the pork and pork product samples / Kovalev L.I., Shishkin S.S., Kovaleva M.A., Ivanov A.V., Vostrikova N.L., Chernukha I.M. // *All About Meat* . — 2013. — № 3. — P. 32–34.
9. Novel markers for tying-up in horses by proteomics analysis of equine muscle biopsies / F.G. Bouwman, M.M van Ginneken, J.H. van der Kolk, E.C. Mariman // *Comp BiochemPhysiol Part D Genomics Proteomics.* — 2010. — V. 5 — № 2. — P. 178–183. DOI: 10.1016/j.cbd.2010.03.009.
10. Shibata, M. Differential expression of the skeletal muscle proteome in grazed cattle / M. Shibata, K. Matsumoto, M. Oe et al. // *J. anim. Sci.* — 2009. — V. 87. — № 8. — P. 2700–2708.
11. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources / N.L. Anderson, M. Polanski, R. Pieper, et al. // *Mol. Cell Proteomics.* — 2004. — V. 3. — № 4. — P. 311–326.
12. Application of proteomic technologies for analysis of muscle proteins from farm animal used in the meat industry (a review) / S.S. Shishkin, L.I. Kovalev, M.A. Kovaleva // *Applied biotechnology and microbiology.* — 2014. — № 5. — P. 453–465.
13. Shishkin S.S., Kovaleva M.A., Eryomina L.S., Lisitskaya K.V., Kovalev I.I. Proteomic Approaches for the Study of Transgelins as Tumor-associated Proteins and Potential Biomarkers. // *Current Proteomics.* — 2013. — V. 10. — № 2. — P. 165–178

## AUTHOR INFORMATION

## Affiliation

**Vostrikova Natalya Leonidovna** — candidate of technical sciences, head of laboratory «Scientific and methodical work, biological and analytical research», The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: 8-495-676-79-81  
E-mail: [nvostrikova@list.ru](mailto:nvostrikova@list.ru)

**Chernukha Irina Mihailovna** — doctor of technical sciences, professor, corresponding members of RAS, leading research scientist of Experimental clinic — laboratory «Biologically active substances of an animal origin», The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: 8-495-676-97-18  
E-mail: [imcher@inbox.ru](mailto:imcher@inbox.ru)

## Contribution

The 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 20.12.2016

# PROTEOMICS IN MEAT SCIENCE — CURRENT STATUS AND FUTURE PERSPECTIVE

## ПРОТЕОМИКА В НАУКЕ О МЯСЕ — СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Zamaratskaia G.<sup>1,2</sup>, Li S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala BioCenter, Department of Food Science, Uppsala, Sweden

<sup>2</sup> University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Zatisi, Vodnany, Czech Republic

<sup>3</sup> School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University; National Engineering Research Center of Seafood, Dalian, P. R. China

**Ключевые слова:** обзор, протеомика, качество мяса, безопасность мяса, аналитические методы.

**Keywords:** review, proteomics, meat quality, meat safety, analytical methods.

### Аннотация

Целью протеомики является идентификация всех белков, их биологической активности, пост-трансляционных модификаций и взаимоотношений в клетке, и идентификация изменений в «протеоме» в ответ на измененные биологические условия. Типичная последовательность операций в протеомике включает экстракцию и разделение белков, идентификацию белков или пептидов и анализ данных. Наиболее распространенным методом, используемым для определения белков или пептидов в протеомике, является масс-спектрометрия. Эта стратегия имеет множество применений, включая исследования в науке о мясе, но она ограничена огромной биохимической гетерогенностью белков и неспособностью точного определения малораспространенных белков. Целью данного обзора является суммирование современного знания и идентификация будущих потенциальных применений протеомики в науке и технологии мясной промышленности.

### Abstract

The aim of proteomics is to identify all proteins, their biological activity, post-translational modifications and interactions in a cell, and to identify (quantify?) changes in «proteome» in response to altered biological conditions. A typical proteomics work flow consists of protein extraction, separation, protein or peptide identification and data analysis. Mass spectrometry is the most common method used to detect proteins or peptides in proteomics. This strategy has many applications, including research in meat science, but it is limited by huge biochemical heterogeneity of the proteins and an inability to detect accurately low-abundance proteins. The aim of the present review is to summarize the current knowledge and identify future potential application of proteomics in meat science and technology.

### Введение

В последние десятилетия, научное сообщество сталкивается с быстрым развитием и совершенствованием омических методов с высокой пропускной способностью. Развитие этих методов также значительно изменило экспериментальные подходы в науках о пищевых продуктах. Омика, в целом, является очень динамичной областью, которая быстро прогрессирует. Все больший интерес вызывает использование геномики, протеомики и метаболомики в науке о мясе для получения полезной информации о различных характеристиках мяса и освещения молекулярного механизма, лежащего в основе вариаций в этих характеристиках.

Термин «протеомика» появился в 1995 г. для описания крупномасштабной характеристики всего белкового комплекса линии клеток, тканей или организма [1]. Протеомика — это изучение определенного протеома, то есть полного комплекса белков, вырабатываемых биологической системой при определенных физиологических условиях и в определенное время. Любые модификации, возникающие в определенном

### Introduction

In the last decades, the scientific community has faced a rapid development and maturation of high-throughput, omics technologies. This has also dramatically changed the experimental approaches in food-related sciences. Omics in general is a very dynamic area which advancing very rapidly. A growing interest is directed towards the use of genomics, proteomics and metabolomics in meat science to extract useful information about various meat characteristics and elucidating molecular mechanism behind variations in these characteristics.

The term «proteomics» was invented in 1995 to describe a large-scale characterization of the entire protein complement of a cell line, tissue, or organism [1]. Proteomics is a study of a specific proteome which is the entire complement of proteins produced by a biological system under specific physiological conditions and at a specific time. Any modifications occurred to a particular set of proteins,

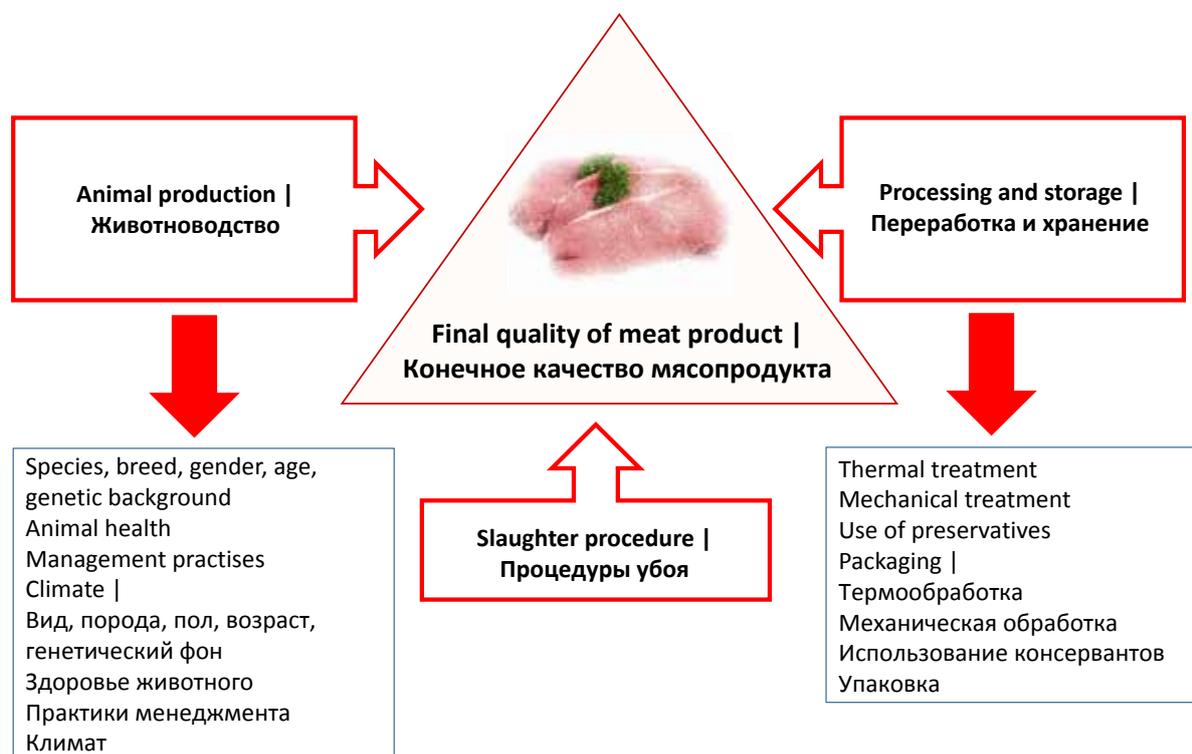


Figure 1. Factors determining final quality of meat product

Рис. 1. Факторы, определяющие конечное качество мясoпродукта

наборе белков, могут быть изучены с использованием протеомики. В науках о жизни, включая сельское хозяйство, науки о пищевых продуктах и животных, использование протеомики является большим шагом вперед для получения безопасного пищевого продукта превосходного качества и для улучшения экологической рациональности животноводства.

Состав мяса, сенсорное качество и питательная ценность являются важными характеристиками, которые определяют качество мяса и его приемлемость для потребителей. На качество мяса оказывают влияние предубойная обработка живых животных и серия послеубойных событий, а также переработка и условиях хранения (рис. 1). Протеомика является перспективным подходом для изучения механизмов, лежащих в основе различных качественных признаков мяса и влияния мяса на здоровье человека.

Целью данного обзора является суммирование современных знаний и идентификация будущего потенциального применения протеомики в науке и технологии мясной промышленности.

#### *Поточная схема процесса протеомного исследования*

Последние достижения в контрольно-измерительном оборудовании и биоинформатике позволяют анализировать протеом (рис. 2). Одним из наиболее широко используемых методов профилирования является двухмерный гель-электрофорез (2DGE), в котором белки разделяются в соответствии с их изоэлектрическими точками в первом направлении

can be studied using proteomics. In life sciences including agriculture, food and animal sciences, the use of proteomics is a great step towards to achieve safe product of superior quality and to improve sustainability of animal production.

Meat composition, sensory quality and nutritional value are important characteristics which determine meat quality and acceptability by consumers. Meat quality is affected by pre-slaughter handlings of live animal and a series of the postmortem events, as well as by processing and storage conditions (Fig. 1). Proteomics is a promising approach to study the underlying mechanisms of different meat quality traits and the effect of meat on human health.

The aim of the present review is to summarize the current knowledge and identify future potential application of proteomics in meat science and technology.

#### *Proteomics process flow chart*

Recent advances in instrumentation and bioinformatics have made it possible to analyze the proteome (Fig. 2). One of the most widely used profiling approaches is two-dimensional gel electrophoresis (2DGE), in which the proteins are separated according to their isoelectric points in the first dimension and according to their molecular

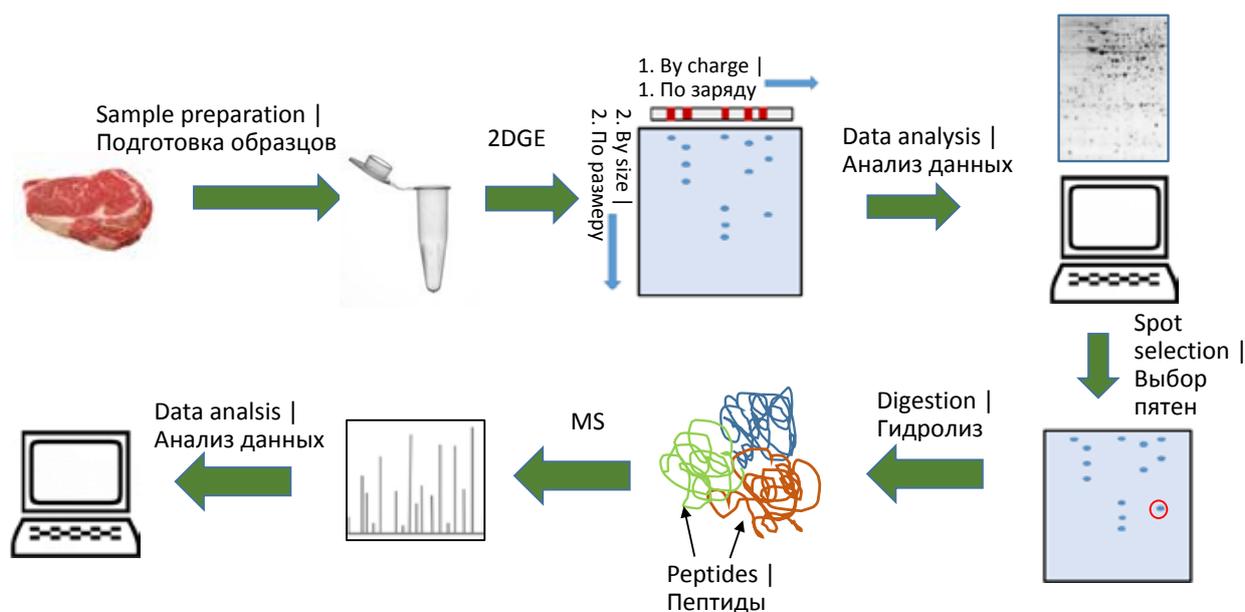


Figure 2. A schematic representation of the proteomics workflow

Рис. 2. Схематическое представление поточной схемы протеомного исследования

и в соответствии с их молекулярной массой во втором направлении, с последующим протеолизом определенных содержащих белки пятен и масс-спектрометрическим анализом.

2DGE имеет четкое преимущество по сравнению с одномерным гелем-электрофорезом из-за его способности обеспечивать хорошее разрешение белков в сложной смеси не только по относительной молекулярной массе белка, но также и по его изоэлектрической точке. Другим важным моментом является то, что оборудование для 2DGE коммерчески доступно при приемлемой цене. Однако недостатком 2DGE является то, что с его помощью невозможно определить малораспространенные белки.

После разделения методом 2DGE, пятна на геле могут быть индивидуально извлечены и подвергнуты последующему протеолитическому гидролизу. Смесь пептидов, образовавшаяся в результате гидролиза, может быть проанализирована с помощью масс-спектрометрии (MS). Высокая чувствительность и точность MS приводит к расширению протеомного исследования. Белки или пептиды могут быть идентифицированы, используя времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF-MS) и электрораспылительную ионизацию — масс-спектрометрию с квадрупольной ионной ловушкой (ESI-Q-IT-MS). MALDI-ToF-MS является быстрым, точным методом, который способен определить пептид на уровне ф-моль. ESI-Q-IT-MS обычно используется для получения данных о последовательности пептидов. Новейшее протеомное оборудование также включает тандемный времяпролетный масс-спектрометр с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF/TOF), который обеспечивает информацией о последовательности

weights in the second dimension, followed by proteolysis of particular protein-containing spots and mass spectrometric analysis.

2DGE has a clear advantage over 1-dimensional electrophoresis because of its ability to provide good resolution of proteins in a complex mixture not only on the relative molecular weight of a protein, but also on its isoelectric point. Another important point is that equipment for 2DGE is commercially available with reasonable price. However, the drawback of 2DGE is that it is not possible to detect low-abundance proteins.

Following 2DGE separation, the gel spots can be individually excised and subjected to subsequent proteolytic digestion. The mixture of peptides produced upon digestion can be analyzed with mass spectrometry (MS). The high sensitivity and accuracy of MS led to an expansion of proteomics research. Proteins or peptides can be identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS (MALDI-ToF-MS) and electrospray ionization-quadrupole ion trap MS (ESI-Q-IT-MS). MALDI-ToF-MS is a fast, accurate method, which is able to detect peptide at fmol levels. ESI-Q-IT-MS is usually used to obtain peptide-sequence data. The newest proteomics equipment also includes the MALDI tandem-time-of-flight (MALDI-ToF/ToF) mass spectrometer, which provide peptide-sequence information. It should

пептидов. Необходимо отметить, что не существует идеального протокола, который может быть применен для всех протеомных исследований.

### Протеомика в исследованиях биохимии мышц

Большинство мясопродуктов производят из скелетных мышц; таким образом, необходимо четкое понимание биохимии скелетных мышц для понимания биохимической основы процесса превращения мышц в мясо.

Количество протеомных исследований с целью характеристики биохимии мышц быстро увеличивается. Большинство исследований используют 2DGE высокого разрешения или жидкостную хроматографию в комбинации с масс спектрометрией (MS) для идентификации белка с высокой пропускной способностью [2, 3, 4, 5, 6].

Bouley et al. [7] идентифицировали 129 белков в мышце *Semitendinosus* от КРС породы шароле, используя 2DGE и иммобилизованный градиент pH 4–7 в первом направлении и MS. Применение полосок pH 4–7 может ограничивать визуализацию основных белков, но в целом метод показал хорошую воспроизводимость. Идентифицированные белки были в основном вовлечены в клеточную структуру, защиту клеток, метаболизм мышц и сократительный аппарат. Наиболее крупными белками, идентифицированными в данном исследовании, были миозин-связывающий белок С 128,29 кДа, а наименьшим был ацил-КоА-связывающий белок 9,91 кДа.

Нежность считается одним из наиболее важных характеристик качества мяса. Нежность в основном определяется степенью протеолиза ключевых миофибриллярных и цитоскелетных белков в мышце и последующими изменениями структуры мышц. Эндогенная кальций-зависимая калпаиновая система является важным регулятором протеолиза в послеубойных условиях. Активность калпаинов регулируется ингибитором калпастатином. Протеомика интенсивно используется для изучения послеубойного протеолиза. Протеомный подход также был способен идентифицировать другие белки, а именно субъединицу альфа АТФ синтазы и альфа актинин 3, которые могут быть вовлечены в регулирование калпаинов в мышце [8]. Протеомика показала, что более 100 различных белковых пятен были изменены после убоя, вероятно, в результате протеолиза [2]. Morzel et al [9] идентифицировали изменения в тропонине Т, актине,  $\alpha$ -кристаллине, миокиназе, креатининкиназе и митохондриальной АТФазе, а также сайфер (cypher) — белках и миозенине в свинине в течение 72 ч созревания. Содержание связанных со стрессом белков снижалось в саркоплазматической фракции при созревании [10].

Идентификация биомаркеров, связанных с нежностью мяса, имеет большое значение для мясной промышленности. В настоящее время существует

be noted that there is no ideal protocol which can be applied to all proteomics research.

### Proteomics in research on muscle biochemistry

Most meat products are derived from skeletal muscles; thus, clear understanding of biochemistry of skeletal muscle is essential in understanding the biochemical basis of a process of muscle to meat conversion.

Number of proteomic studies to characterize muscle biochemistry is rapidly increasing. Most studies use high-resolution 2DGE or liquid chromatography, in combination with mass spectrometry (MS) for high-throughput protein identification [2, 3, 4, 5, 6].

Bouley et al. [7] identified 129 proteins in *Semitendinosus* muscle of Charolais cattle using 2DGE using an immobilized pH 4–7 gradient in the first dimension and MS. The use of pH 4–7 strips might limit visualization of basic proteins, but generally the method showed a good reproducibility. The identified proteins were mainly involved in cell structure, cell defense muscular metabolism and the contractile apparatus. The largest protein identified in that study was the 128.29 kDa myosin-binding protein C, and the smallest was the 9.91 kDa acyl-coA-binding protein.

Tenderness is considered as one of the most important feature for meat quality. Tenderness is mainly determined by the degree of proteolysis of key myofibrillar and cytoskeletal proteins within muscle and subsequent alterations of muscle structure. The endogenous calcium-dependent calpain system is an important regulator of proteolysis under postmortem conditions. Activity of calpains are regulated by the inhibitor calpastatin. Proteomics was intensively used to study postmortem proteolysis. Proteomic approach was also able to identify other proteins, namely ATP synthase subunit alpha and alpha actinin 3, which may be involved in the regulation of the calpains in muscle [8]. Proteomics revealed that more than 100 different protein spots have been altered postmortem likely as result of proteolysis [2]. Morzel et al [9] identified changes in troponin T, actin,  $\alpha$ -crystallin, myokinase, creatine kinase and mitochondrial ATPase, as well as cypher proteins and myozenin in pork during 72 hours ageing. Content of stress-related proteins decreased in the sarcoplasmic fraction with ageing [10].

Identification of biomarkers related to meat tenderness is of major importance for meat industry. Recently, a wide range of data was to identify compounds related

большое количество данных для идентификации соединений, связанных с нежностью мяса. Многие из этих данных были получены с использованием 2DGE and MS [11]. Было высказано предположение, что среди 21 изученного белка, небольшой белок теплового шока Hsp70-1B может служить биомаркером недостаточной нежности говядины [12]. Другие более ранние исследования говорят о том, что такие биомаркеры как изоформы тяжелой цепи миозина или цепь В лактатдегидрогеназы, по всей вероятности, являются специфичными для мышцы или породы. В общем, сократительные и метаболические свойства отдельной мышцы играют основную роль в развитии нежности. В целом, послеубойная деструкция ряда белков была детально изучена. Однако недостаточно ясно, как эти белки вовлечены в тендеризацию мяса.

Водоудерживающая способность (ВУС) также является одной из наиболее важных качественных характеристик свежего мяса, которая оказывает влияние на внешний вид и выход мяса, и, в конечном счете, на воспринимаемую сочность мяса после термообработки. Протеомика была применена для изучения динамики ВУС мышцы *longissimus lumborum* яка после убоя [13]. В этом исследовании для идентификации белков использовали MALDI TOF/TOF, и было показано, что содержание 55 белков, включая легкую цепь миозина, белок теплового шока 27 и триозофосфат изомеразу различалось в 0, 1 и 7 дни послеубойного созревания. Примером слабой ВУС является бледное, дрябкое и экссудативное (PSE) мясо. Фундаментальную основу бледного, дрябкого и экссудативного (PSE) мяса куриных грудок изучали, используя протеомный подход.

Во время созревания мяса также происходят изменения в соединительной ткани, которые, по меньшей мере, частично способствуют растворению коллагена во время термообработки. Протеомный подход был использован для изучения влияния термообработки на модификацию белка в ягнятине [14]. Коллаген типа I и типа III был определен после термообработки в течение 10 мин., указывая на то, что экстрагируемость этих белков увеличивалась после термообработки.

Связь между качеством мяса и предубойными условиями у животных также была охарактеризована с помощью протеомики. Morzel et al. [9] сообщили, что митохондриальная АТФ-аза была сверхэкспрессирована у свиней, транспортированных непосредственно перед убоем по сравнению с теми, которые были транспортированы за день до убоя. Amid et al [15] применили протеомику для изучения профилей белков куриных сердец и идентифицировали тропонин I и альфа актин 1 сердечной мышцы как потенциальные маркеры электростимулированных птиц. Газовое оглушение/убой до перерезания шеи активировало экспрессию бета-енолазы, пируваткиназы и креатин-

to meat tenderness. Many of these data was produced using 2DGE and MS [11]. It was suggested that small heat shock protein Hsp70-1B among 21 studied proteins, might serve as a biomarker of low tenderness in beef [12]. Other earlier studies suggested biomarkers such as myosin heavy chain isoforms or lactate dehydrogenase chain B seemed to be muscle- or breed-specific. Overall, contractile and metabolic properties of a single muscle play a major role in the elaboration of tenderness. Generally, postmortem degradation of several proteins has been studied in great detail. However, it is not well understood how these proteins are involved in the meat tenderization.

Water-holding capacity (WHC) is also one most important quality of fresh meat, which affects the appearance and yield of meat and ultimately the perceived juiciness of meat after cooking. Proteomics was applied to study dynamic of WHC of yak *longissimus lumborum* during postmortem [13]. In that study, MALDI TOF/TOF was used to identify proteins, and it was shown that content of 55 proteins, including myosin light chain, heat shock protein 27 and triosephosphate isomerase, differed at days 0, 1 and 7 during postmortem aging. Poor WHC is exemplified in pale, soft, and exudative (PSE) meat. The fundamental basis of pale, soft, and exudative (PSE) breast meat in chicken has been studied using the proteomic approach.

Connective tissue also undergoes alterations during meat ageing, which at least partly enables the solubilization of collagen during cooking. Proteomic approach was used to study the effect of heat treatment on protein modifications in lamb meat [14]. The collagens type I and type III were detectable after cooking for 10 min suggesting that the extractability of these proteins increased after the heat treatment.

Association between meat quality and pre-slaughter conditions of animals was also characterized with help of proteomics. Morzel et al. [9] reported that mitochondrial ATPase was over-expressed in pig transported immediately before slaughter compared to these transported the day before slaughter. Amid et al [15] applied proteomics to study protein profiles of chicken hearts and identified troponin I and alpha cardiac muscle actin 1 as potential markers of electrically stimulated birds. Gas stun-to-kill prior to neck cut up-regulated the expression of beta-enolase, pyruvate kinase and creatine kinase in breast muscles in

киназы в мышцах грудок цыплят-бройлеров по сравнению с халальным убоем без оглушения [16].

Иммунокастрация (иммунизация против гонадотропин-рилизинг гормона) самцов свиней — это щадящая альтернатива хирургической кастрации для снижения риска привкуса хряка. Было проведено сравнение протеомных профилей мышц от хирургически кастрированных самцов свиней и иммунокастрированных свиней [17]. Установлено, что 50 из 610 идентифицированных белков по-разному экспрессировались при иммуно- и хирургической кастрации.

Кроме того, протеомика была использована для изучения влияния рациона на рост бройлеров и конечное качество мяса [3].

#### *Протеомика в исследовании качества переработанного мяса*

Протеомный анализ может быть использован для изучения качества мяса и идентификации биомаркеров качества мяса. Это особенно сложно при анализе белков в переработанных продуктах, которые состоят из мяса, жира, специй, добавок и т.д., из-за их многокомпонентности и часто гетерогенности.

Научные данные по протеомным методам для изучения переработанных мясopодуKтов ограничены. Šklerp et al. [18] использовали протеомику для сравнения нерастворимой белковой фракции в мышце *biceps femoris* сухого посола в соответствии с двумя различными генотипами (PRKAG3 и CAST), и показали, что PRKAG3 в основном влиял на метаболические ферменты мышц, указывая на влияние генотипа на метаболизм мышц. CAST влиял только на количество одного фрагмента актина. То же самое исследование продемонстрировало, что уровни соли в продукте сухого посола оказывают существенное влияние на его протеомный профиль, особенно метаболические ферменты, белки плазмы, шапероны и миофибрилярные белки [18]. Pioselli et al [19] идентифицировали тропонин, миозин, актин и фрагмент сывороточного альбумина как маркеры технологического процесса, используемого для термообработанных окороков.

#### *Протеомика в исследовании фальсификации мяса*

Потребители требуют надежной информации о мясе, которое они потребляют. К сожалению, фальсификация пищевых продуктов не является единичным случаем. В 2013 г. Великобритания была шокирована скандалом, когда в продукты из говядины была подмешана не декларированная конина. Идентификация видов мяса в мясopодуKтах, таким образом, является важной для выявления фальсификации или мошеннической замены и для приобретения доверия потребителей. Были предложены несколько методов, в основном методы, основанные на ДНК и твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA). В настоящее

бройлер chickens compared with Halal slaughtering without stunning [16].

Immunocastration (immunization against gonadotropin releasing hormone) of male pigs is a friendly alternative to surgical castration to reduce the risk of boar taint. Proteomic profiles of muscles from surgically castrated male pig and immunocastrated pigs were compared [17]. It was shown that 50 of 610 identified proteins were differentially expressed in immuno- and surgical castration.

In addition, proteomics has been used to investigate dietary effects on broiler growth and final meat quality [3].

#### *Proteomics in research on processed meat quality*

Proteomics analysis can be used to study meat quality and to identify biomarkers for meat quality. It is particularly challenging to analyze proteins in processed products, which consist of meat, fat, spices, additives et cetera, due to their complexity and often heterogeneity.

The scientific data on proteomics approach to study processed meat products is limited. Šklerp et al. [18] used proteomics to compare insoluble protein fraction of dry-cured *biceps femoris* according to two different genotypes (PRKAG3 and CAST), and showed that the PRKAG3 affected mainly muscle metabolic enzymes, indicating an effect of genotypes on muscle metabolism. The CAST only affected the quantity of one actin fragment. The same study demonstrated that levels of salt in dry-cured product significantly affected its proteomic profile, especially metabolic enzymes, plasma proteins, chaperones and myofibrillar proteins [18]. Pioselli et al [19] identified tropomyosin, myosin, actin and a fragment of serum albumin as markers of the technological procedure used for cooked ham.

#### *Proteomics in research on meat fraud*

Consumers demand reliable information about meat they consume. Unfortunately, food fraud is common. In 2013, the United Kingdom was shocked by a scandal in which beef products were adulterated with non-declared meat from horse. The identification of meat products species is therefore important to detect adulteration or fraudulent substitution and gain consumer's trust. Several methods have been suggested, mainly DNA-based methods and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The possi-

время изучается возможность применения протеомного подхода для обеспечения идентификации видов мяса, но данные все еще ограниченные. Von Barga et al [20] разработал чувствительный масс-спектрометрический метод с мониторингом множественных реакций (MRM), который позволил определить низкие концентрации свинины и конины в образцах халальной говядины.

Были установлены межвидовые различия в 2DGE профиле белков между свиньями, курами, КРС, индюками, утками и гусями как в сырье, так и в переработанных мясопродуктах, таких как ферментированные колбасы [21, 22].

В последнее время распространено добавление соевого белка к мясопродуктам из-за его пищевых и функциональных свойств. Количество сои в мясопродуктах регулируется федеральными и государственными регулирующими органами. Для контроля количества добавленной сои обычно используется ELISA. Однако этот метод недостаточно удовлетворительный из-за его ограниченной достоверности и низкой точности. Leitner et al [23] применили перфузионную ЖХ в комбинации с УФ определением для установления различий между образцами с и без добавленных соевых белков.

#### *Протеомика в исследовании благополучия животных*

Благополучие животных — это многогранный термин, который включает, но не ограничен здоровьем животных и их способностью проявлять естественное поведение. Протеомика может быть использована практически во всех областях здоровья, выращивания и оценки благополучия животного.

Marco-Ramell et al. [24] оценил валидность традиционных биомаркеров стресса у свиней, содержащихся при высокой плотности (плотность поголовья 0,25 м<sup>2</sup>/свинью), используя протеомный подход (дифференциальный гель-электрофорез и MS) и предложили актин как новый потенциальный сывороточный биомаркер стресса, что является интересным результатом. Ранее было высказано предположение, что актин может быть использован как общий маркер повреждения клеток [25]. Однако Marco-Ramell et al. [24] не установил корреляции между актином и креатинкиназой, указывая на то, что повышенные уровни актина у свиней, содержащихся при высокой плотности, не были специфически ассоциированы с повреждением скелетных мышц. Свиньи, содержащиеся в условиях низкой и высокой плотности, также показали различия в общем холестерине, холестерине липопротеинов низкой плотности и в уровнях свиного основного белка острой фазы. Позже Marco-Ramell et al. [26] идентифицировали глутатион пероксидазу, гликопротеин  $\alpha 2$  Heremans Schmid, холестерин и фекальный кортикостерон как потенциальные биомаркеры

ability to apply a proteomic approach to enable identification of meat species is under investigations, but data is still limited. Von Barga et al [20] developed sensitive multiple reaction monitoring (MRM) mass spectrometry method which allowed to detect low concentrations of pork and horse meat in halal beef samples.

Inter-species differences in 2DGE protein profile was detected between pig, chicken, cattle, turkey, duck and goose in both raw material and processed meat products such as fermented sausage [21, 22].

Addition of soybean protein to meat products has lately spread due to the nutritional and functional properties. The amount of soybean in meat product is regulated by federal and state regulatory agencies. To control the amount of added soybean, ELISA is commonly used. However, this method is not fully satisfactory because of its limited reliability and low accuracy. Leitner et al [23] applied perfusion LC in combination with UV detection to differentiate between samples with and without added soybean proteins.

#### *Proteomics in research on animal welfare*

Animal welfare is a multifaceted term, which involves but not limited to animal health and ability to display natural behavior. Proteomics can be used in virtually all areas of animal health, production and welfare assessment.

Marco-Ramell et al. [24] evaluated the validity of traditional stress biomarkers in pigs housed at high density (stocking rate of 0.25 m<sup>2</sup>/pig) using proteomics approach (differential gel electrophoresis and MS), suggested actin as a novel potential serum stress biomarker, which is an interesting finding. It was previously suggested that actin can be used as a general marker for cell damage [25]. However, Marco-Ramell et al. [24] found no correlation between actin and creatine kinase, indicating that increased actin levels in pigs housed at high density was not specifically associated to skeletal muscle damage. Pigs housed in low and high density environment, also showed differences in total cholesterol, low density lipoprotein-associated cholesterol and in levels of the pig-major acute phase protein. Later, Marco-Ramell et al. [26] identified glutathione peroxidase,  $\alpha 2$  Heremans Schmid glycoprotein, cholesterol, and fecal corticosterone, as potential biomarkers of stress in Bruna cows caused by hard living conditions. In this study, two-

стресса у коров бурой породы, вызванного тяжелыми условиями содержания. В данном исследовании были использованы двумерный электрофорез и MALDI-MS или MS с ионной ловушкой.

### Вызовы

Протеомика — это сложный метод из-за огромной биохимической гетерогенности белков. Геном сельскохозяйственного животного (свиньи, коровы или куры), который состоит из приблизительно 20000 генов, потенциально может продуцировать 1,8 млн. различных белков [27]. Кроме того, многие белки, например, факторы транскрипции, присутствуют в небольших количествах и не могут быть с легкостью идентифицированы. Однако эти белки представляют интерес, так как они могут быть биомаркерами или физиологического состояния животного, или качества мяса. Выявление гидрофобных и мембранных белков также представляет сложности. Было определено относительно небольшое количество гидрофобных и мембранных белков из-за их гидрофобности и низкой растворимости.

### Выводы

Протеомика обладает большим потенциалом в науках о мясе и животных. Во-первых, протеомика может быть использована для характеристики биохимических событий в отношении качества мяса при послеубойном созревании. Во-вторых, протеомика может предоставить полезную информацию о фальсификации мяса, а также о влиянии хранения на качество и безопасность мяса. В-третьих, протеомика может выявить взаимоотношение между качеством мяса и здоровьем и благополучием животных. Кроме того, протеомика может быть использована для обнаружения биомаркеров, которые могут быть применены для улучшения качества мяса, а также снижения вариабельности в качестве мяса.

dimensional electrophoresis and MALDI-MS or ion trap MS were used.

### Challenges

Proteomics is a challenging approach because of huge biochemical heterogeneity of the proteins. A genome of livestock animal (swine, cow or chicken), which consists of approximately 20000 genes, can potentially produce 1.8 million different proteins [27]. Additionally, many proteins, for example transcription factors, occur in low quantity and cannot be readily detected. However, these proteins are of interest, because they can be biomarkers of either physiological status of animal or meat quality. Detection of hydrophobic and membrane proteins is also challenging. Relatively low number of hydrophobic and membrane proteins have been detected due to their low solubility and hydrophobicity.

### Conclusion

There is a huge potential for proteomics in meat and animal-related sciences. First, proteomics can be used in characterization of biochemical events in relation to meat quality during postmortem aging. Second, proteomics may provide useful information about meat adulteration and also the effect of storage on meat quality and safety. Third, proteomics can reveal a relationship between meat quality and animal health and welfare. Furthermore, proteomics can be used for the discovery of biomarkers that can be used to improve meat quality as well as reduce meat quality variability.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Anderson N.G., Anderson N.L., 1996. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 17:443-453.
- Lametsch R., Bendixen E., 2001. Proteome analysis applied to meat science: Characterizing postmortem changes in porcine muscle. *J. Agric. Food Chem.* 49:4531-4537.
- Paredi G., Raboni S., Bendixen E., de Almeida A.M., Mozzarella A., 2012. «Muscle to meat» molecular events and technological transformations: the proteomics insight. *J Proteomics* 75(14):4275-4289. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.04.011.
- Soares R., Franco C., Pires E., Ventosa M., Palhinhas R., Koci K., Martinho de Almeida A., Varela Coelho A., 2012. Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species. *J Proteomics* 75(14):4190-206. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.04.009.
- Longo V., Lana A., Bottero M.T., Zolla L., 2015. Apoptosis in muscle-to-meat aging process: The omic witness. *J Proteomics* 125:29-40.
- Yang H., Xu X.L., Ma H.M., Jiang J., 2016. Integrative analysis of transcriptomics and proteomics of skeletal muscles of the Chinese indigenous Shaziling pig compared with the Yorkshire breed. *BMC Genet.* 17(1):80.
- Bouley J., Chambon C., Picard B., 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 24:1811-24.
- Brulé C., Dargelos E., Diallo R., Listrat A., Béchet D., Cottin P., Poussard S., 2010. Proteomic study of calpain interacting proteins during skeletal muscle aging. *Biochimie* 92:1923-1933.
- Morzel M., Chambon C., Hamelin M., Santé-Lhoutellier V., Sayd T., Monin G., 2004. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci.* 67(4):689-96. DOI: 10.1016/j.meatsci.2004.01.008.
- Di Luca A., Elia G., Mullen A.M., Hamill R.M., 2013. Monitoring post mortem changes in porcine muscle through 2-D DIGE proteome analysis of Longissimus muscle exudate. *Proteome Science* 11: 14.
- Ouali A., Gagaoua M., Boudida Y., Becila S., Boudjellal A., Herrera-Mendez C.H., Sentandreu M.A., 2013. Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci* 95: 854-870.
- Picard B., Gagaoua M., Micol D., Cassar-Malek I., Hocquette J.F., Terlouw C.E., 2014. Inverse relationships between

biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *J Agric Food Chem.* 62(40):9808-9818.

13. Zuo H., Han L., Yu Q., Niu K., Zhao S., Shi H., 2016. Proteome changes on water-holding capacity of yak longissimus lumborum during postmortem aging. *Meat Sci.* 121:409-19. DOI: 10.1016/j.meatsci.2016.07.010.

14. Yu T.Y., Morton J.D., Clerens S., Dyer J.M., 2016. Proteomic investigation of protein profile changes and amino acid residue-level modification in cooked lamb longissimus thoracis et lumborum: The effect of roasting. *Meat Sci.* 119:80-8. DOI: 10.1016/j.meatsci.2016.04.024.

15. Amid A., Samah N.A., Yusof F., 2012. Identification of troponin I and actin, alpha cardiac muscle 1 as potential biomarkers for hearts of electrically stimulated chickens. *Proteome Sci.* 10(1):1. DOI: 10.1186/1477-5956-10-1.

16. Salwani M.S., Adeyemi K.D., Sarah S.A., Vejayan J., Zulkifli I., Sazili A.Q., 2015. Skeletal muscle proteome and meat quality of broiler chickens subjected to gas stunning prior slaughter or slaughtered without stunning. *CyTA. J. Food* 14:1-7 DOI: 10.1080/19476337.2015.1112838.

17. Shi X., Li C., Cao M., Xu X., Zhou G., Xiong Y.L., 2016. Comparative proteomic analysis of longissimus dorsi muscle in immunized and surgically castrated male pigs. *Food Chem.* 199:885-92.

18. Skrllep M., Candek-Potokar M., Mandelc S., Javornik B., Gou P., Chambon C., Sante-Lhoutellier V., 2011. Proteomic profile of dry-cured ham relative to PRKAG3 or CAST genotype, level of salt and pastiness. *Meat Sci* 88:657-667.

19. Pioselli B., Paredi G., Mozzarelli A., 2011. Proteomic analysis of pork meat in the production of cooked ham. *Molecular Biosystems* 7:2252-2260.

20. Von Bargen C., Dojahn J., Waidelich D., Humpf H.U., Brockmeyer J. 2013. New sensitive high-performance liquid chroma-

tography tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in halal beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11986-11994.

21. Montowska M., Pospiech E., 2012. Myosin light chain isoforms retain their species-specific electrophoretic mobility after processing, which enables differentiation between six species: 2DE analysis of minced meat and meat products made from beef, pork and poultry. *Proteomics* 12: 2879-2889.

22. Montowska M., Pospiech E., 2013. Species-specific expression of various proteins in meat tissue: proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species, *Food Chem* 136: 1461-1469.

23. Leitner A., Castro-Rubio F., Marina M.L., Lindner W., 2006. Identification of marker proteins for the adulteration of meat products with soybean proteins by multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* 5(9):2424-2430.

24. Marco-Ramell A., Pato R., Peña R., Saco Y., Manteca X., Ruiz de la Torre J.L., Bassols A., 2011. Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Vet J* 190:e66-e71. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.01.003.

25. Wang P., Bouwman F.G., Mariman E.C., 2009. Generally detected proteins in comparative proteomics – a matter of cellular stress response? *Proteomics* 9: 2955-2966

26. Marco-Ramell A., Arroyo L., Saco Y., García-Heredia A., Camps J., Fina M., Piedrafita J., Bassols A., 2012. Proteomic analysis reveals oxidative stress response as the main adaptive physiological mechanism in cows under different production systems. *J Proteomics.* 2012 75(14):4399-4411. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.04.002.

27. Jensen O.N., 2004. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:33-41.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

### Принадлежность к организации

**Замаратская Галия** — Кандидат технических наук, Ассоциированный профессор, научный работник, Шведский университет аграрных наук, Биоцентр, Департамент пищевых наук, г. Упсала, Швеция

Box 7051, SE-750 07 Uppsala, Sweden

Тел.: +46-18-67-20-05

E-mail: Galia.zamaratskaia@slu.se

**Ли Шенджие** — Кандидат технических наук, преподаватель, Школа пищевой науки и технологии, Даляньский политехнический университет; Национальный инженеринговый исследовательский центр морепродуктов, Далян, Народная Республика Китай

Dalian 116034, P. R. China

Тел.: +86-411-86-318-675

E-mail: shengjie.li2016@outlook.com

### Критерии авторства

Замаратская Галия спланировала содержание обзорной статьи, участвовала в подготовке статьи и критически отредактировала статью для важного интеллектуального контента.

Ли Шенджие принимал активное участие в подготовке статьи и критически принимал участие в редактировании статьи для важного интеллектуального контента.

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.11.2016

## AUTHOR INFORMATION

### Affiliation

**Zamaratskaia Galia** — PhD, Associate Professor, Swedish University of Agricultural Sciences, researcher, Uppsala BioCenter, Department of Food Science, Uppsala, Sweden

P.O. Box 7051, SE-750 07 Uppsala, Sweden

Tel.: +46-18-67-20-05

E-mail: Galia.Zamaratskaia@slu.se

**Li Shengjie** — PhD, Lecturer, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University; National Engineering Research Center of Seafood, Dalian, P. R. China.

Dalian 116034, P. R. China.

Tel.: +86-411-86-318-675

E-mail: shengjie.li2016@outlook.com

### Contribution

Zamaratskaia Galia planned the review article content, drafted the article and critically revised article for important intellectual content. Li Shengjie was actively involved in drafting the article and critically revised article for important intellectual content.

Responsibility for the work and information is the responsibility of all authors.

### Conflict of interest

The authors declares no conflict of interest.

Received 30.11.2016

# SELECTION OF DNA MATRIX FOR JUSTIFICATION OF THRESHOLD FOR CONTAMINATION OF PROCESSED MEAT PRODUCTS WITH UNDECLARED POULTRY COMPONENTS

## ВЫБОР ДНК МАТРИЦЫ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ ПОРОГОВОГО УРОВНЯ ТЕХНИЧЕСКИ НЕУСТРАНИМЫХ ПРИМЕСЕЙ МЯСА ПТИЦЫ В ГОТОВОЙ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Minaev M.Yu, Solodovnikova G.I., Kurbakov K.A.

The V. M. Gorbatov All-Russian Meat Research Institute, Moscow, Russia

**Ключевые слова:** ПЦР в реальном времени; количественная ПЦР; мясо птицы; технически неустрашимая примесь; фальсификация.

**Keywords:** real-time PCR, quantitative PCR, poultry meat, mitochondrial DNA, cytochrome B, non-removable impurities, adulteration.

### Аннотация

Дифференциация факта фальсификации от случайной перекрестной контаминации сырья на предприятиях мясной промышленности, осуществляющих совместную переработку продуктов убой сельскохозяйственных животных и птицы, необходима для установления порогового уровня технически неустрашимой примеси. Обоснование пороговых значений, например, мяса кур, требует определения целевой аналитической матрицы, содержание которой в мясном сырье стабильно. В российских аттестованных методиках видоспецифической матрицей выявления ДНК кур является многокопийный ген митохондриальной ДНК цитохрома В. Учитывая, что копияность митохондриальной ДНК может зависеть от типа мышечных волокон, возраста животных и других факторов в данном исследовании обоснована эффективность использования многокопийных митохондриальных генов для квантификации содержания мяса птицы в мясных продуктах. Исследование проб мяса 3 образцов тушек кур разных производителей и 1 образца тушки утки, выделенных из грудных и бедренных мышц показало, что в грудных и бедренных мышцах сельскохозяйственных птиц содержится приблизительно равное количество митохондриальной ДНК, что позволяет ее использовать в качестве матрицы для обоснования уровня технически неустрашимой примеси готовой мясной продукции мясом кур.

### Abstract

Differentiation between adulteration and accidental meat raw material contamination in meat industry enterprises that carry out the combined processing of slaughtering products from farm animals and poultry is necessary to establish a threshold of technically non-removable impurities. Justification of the thresholds, e.g. for chicken meat, requires determination of the target analytical matrix, which content in meat raw material is stable. In the Russian certified methods, the species-specific DNA matrix for chickens is a multi-copy gene of cytochrome B in mitochondrial DNA. Taking into consideration that mitochondrial DNA copy number can depend on a muscle fiber type, animal age, and other factors, the effectiveness of using multi-copy mitochondrial genes for quantifying the poultry content in meat products was justified in this study. Analysis of the samples from the pectoral and hip muscles of three chicken carcasses and one duck carcass obtained from different manufacturers showed that the poultry pectoral and hip muscles contained approximately equal amounts of mitochondrial DNA, which allows its use as a matrix to justify the level of technically non-removable chicken impurities in finished meat products.

### Введение

Согласно стратегии развития государственной политики обеспечения качества и безопасности пищевой продукции в РФ приоритетной задачей является обеспечение продовольственного рынка продуктами питания, отвечающим требованиям безопасности, подлинности, качества, а также стимулирование социально-ответственного поведения предпринимательского сообщества при производстве и обращении продукции основанного на принципах добросовестности, формирование рационального потребительского поведения граждан.

### Introduction

According to the development strategy of the state policy in food quality and safety, priority in the Russian Federation is to ensure that food products on the market meet the requirements of safety, authenticity, and quality; to promote socially responsible behavior of the business community in the production and distribution of products based on the principles of fair practice; and to build up rational consumer behavior.

Критерии подлинности мясной продукции заложены в соответствующих нормативных документах. Одним из аттестованных в РФ методов подтверждения подлинности мясной продукции является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данный метод является качественным и основан на использовании ПЦР, который позволяет установить видовой состав исследуемой продукции и определить соответствие информации, вынесенной на этикетку.

Тем не менее, в ряде случаев необходимо дать количественную оценку определяемого ингредиента для дифференциации факта фальсификации состава от значений, характерных для технически неустраняемой примеси. Однако, для разработки количественной методики необходимы эталонные образцы состава, которых в настоящее время не существует.

Применение ПЦР в реальном времени даже при постановке качественной реакции позволяет приблизительно оценить количество определяемой ДНК и соответственно долю мясного ингредиента в исследуемом мясном продукте. Более того, использование ПЦР в реальном времени позволяет регулировать чувствительность метода по так называемым циклам отсечения положительного результата. Это позволит установить пороговые значения содержания того или иного ингредиента и внести изменения в закон РФ о маркировке пищевой продукции. В законодательстве как Таможенного Союза, так и ЕС содержится требование касательно маркировки аллергенов «В случаях, если компоненты, вызывающие аллергию не использовались при производстве пищевой продукции, но их наличие в пищевой продукции полностью исключить невозможно, информация о возможном наличии таких компонентов размещается непосредственно после указания состава пищевой продукции». Данное требование позволяет информировать потребителя о содержании в продукте незначительных количеств обозначенных аллергенов. Обосновав порог технически неустраняемой примеси подобную формулировку можно ввести и в отношении содержания основных видов мясного сырья.

Для обоснования пороговых значений контаминантов необходимо определиться с целевой аналитической матрицей, содержание которой в мясном сырье стабильно. В большинстве ПЦР методов такой матрицей является ген митохондриальной ДНК цитохрома B. В связи с тем, что в клетках мышечной ткани содержится большое количество митохондрий (как правило, более 1000 [1, 2]), ген цитохрома B является многокопийным и его количество определяется типом мышечных волокон, возрастом животного и другими факторами.

В связи с этим, в ряде работ [3, 4] в качестве целевой матрицы для подбора праймеров обосновывается использование однокопийных геномных генов. Тем не менее, во многих других работах, связанных с количественным определением видового состава, в т.ч. ми-

Criteria for meat products authenticity are laid down in the relevant regulations. One of the methods certified in the Russian Federation to confirm the authenticity of meat products is PCR. This method is qualitative; it is based on the use of polymerase chain reaction (PCR), which allows to establish the species composition of the products and to determine the compliance with label claims.

However, in some cases, it is necessary to quantify the specific ingredient to differentiate adulteration of the composition from technically non-removable impurities. However, to develop the quantitative techniques, reference samples are needed, which currently do not exist.

The use of real-time PCR, even in the qualitative mode, allows to estimate the number of determined DNA and, thus, the portion of some meat ingredient in the meat product. Moreover, real-time PCR allows to adjust method sensitivity by the so-called threshold cycles of positive result. This enables the threshold values assignment for the content of various ingredients and the changes to the Russian legislation on the labeling of food products. The laws of Customs Union and EU set out the requirements for labeling concerning allergens "If ingredients causing allergies were not used in the manufacturing of food products, but their presence in such products could not be completely excluded, information of possible presence of such ingredients is placed directly after the information of food product composition". This requirement allows to inform the consumer about the presence of small amounts of specified allergens in the product. By justifying the threshold of technically non-removable impurities, such wording can also be introduced regarding the content of raw meat main types.

To justify the thresholds of contaminants, it is necessary to determine the target analytical matrix, which content in raw meat materials is stable. Most PCR methods use mitochondrial DNA cytochrome B gene as such matrix. Due to the fact that a large number of mitochondria (usually over 1000 [1, 2]) is contained in muscle cells, the cytochrome B gene is a multi-copy one and its number is determined by muscle fiber type, animal age, and other factors.

In this regard, a number of studies [3, 4] demonstrate the use of single-copy genomic genes as the target matrix for the selection of primers. However, in many other works related to the quantification of species composition

кроорганизмов, методом ПЦР широко используются многокопийные гены. [5, 6, 7, 8, 9]

*Galliformes* (курообразные), к которым относятся большинство сельскохозяйственных видов птиц в ходе эволюции потеряли способность к длительным перелетам. При этом основная динамическая нагрузка у них приходится на ноги. Поэтому в отличие от летающих видов птиц у *Galliformes* (курообразные), грудная мышца содержит меньшее количество «медленных» или выносливых волокон с высоким содержанием митохондрий, данные представлены в таблице. При этом мышцы ног выполняют статическую работу, направленную на удержание и динамическую, используемую при активном перемещении, соответственно эти мышцы содержат значительное количество «медленных» волокон (табл. 1). Это может означать, что эти разные по функционалу группы мышц могут содержать примерно равное количество митохондрий, особенно с учетом современных технологий выращивания птицы.

В связи с этим, **целью этой работы** было обоснование использования многокопийных митохондриальных генов для дальнейшего установления порогового уровня технически неустраняемых примесей мяса птицы в готовой мясной продукции.

#### Объекты и методы

Объектами исследования являлись пробы мяса, выделенные из грудных и бедренных мышц трех образцов тушек кур разных производителей и одного образца тушки утки.

by PCR including microorganisms, multi-copy genes are commonly used [5, 6, 7, 8, 9].

*Galliformes*, which include most species of poultry, have lost the capacity for long flights in the course of evolution. Thus, the basic dynamic load falls on legs. Therefore, unlike flying bird species, pectoral muscle in *Galliformes* contains fewer “slow” or high endurance fibers with a high content of mitochondria (the data are presented in the table). At the same time, leg muscles perform static work to hold the animal and dynamic work used in active movements, respectively these muscles contain a significant amount of “slow” fibers (Table 1). This means that these functionally different muscles may contain approximately equal number of mitochondria, particularly in the light of modern poultry breeding technologies.

In this context, **the aim of this work** was to justify the use of multi-copy mitochondrial genes for further establishment of the threshold for technically non-removable poultry impurities in the finished meat products.

#### Objects and methods

The objects of the study were the meat samples derived from the pectoral and hip muscles of 3 chicken carcasses and 1 duck carcass from different manufacturers.

Table 1. Muscle fiber types and their characteristics | Табл. 1. Типы мышечных волокон и их характеристики

Parameters   Параметры оценки	Muscle fiber types   Тип мышечного волокна		
	FT-fibers (fast)   FT-волокна (быстрые)		ST-fibers (slow)   ST-волокна (медленные)
	FTG-fibers   FTG-волокна	FTO-fibers   FTO-волокна	
contraction speed   скорость сокращения	high   высокая	high   высокая	low   низкая
contraction force   сила сокращения	very high   очень большая	high   большая	insignificant   незначительная
aerobic endurance   аэробная выносливость	bad   плохая	good   хорошая	very good   очень хорошая
reactivity   реакционная способность	fast   быстрая	fast   быстрая	slow   медленная
fiber diameter   диаметр волокна	large   большой	medium   средний	small   малый
a method of producing energy   способ получения энергии	glycolysis   гликолиз	glycolysis and oxidation   гликолиз и окисление	oxidation   окисление
content of mitochondria   содержание митохондрий	insignificant   незначительное	medium   среднее	significant   значительное
work duration   продолжительность работы	short   низкая	medium   средняя	long   высокая
capillarization   капилляризация	insignificant   незначительная	good to very good   от хорошей до очень хорошей	very good   очень хорошая
functions   выполняемые функции	anaerobic work: activity in submaximal zone, manifestation of maximum power and fast power   анаэробная работа: нагрузки в субмаксимальной зоне, проявление максимальной и скоростной силы	long anaerobic activity of medium intensity, fairly intense aerobic activity   продолжительная анаэробная нагрузка средней интенсивности, довольно интенсивная аэробная нагрузка	aerobic work, endurance and strength endurance, static work to support and hold   аэробная работа, выносливость и силовая работа на опору и удержание

### *Отбор проб*

Образцы мяса измельчали на ножевом гомогенизаторе Retsch GM200. От каждой группы мышц отбирали по 3 навески массой  $50 \pm 1,0$  мг.

В работе используется следующая кодировка образцов. Пробы мяса грудной мышцы кур следующие коды: 1-ГМ, 2-ГМ, 3-ГМ; утки- У-ГМ и мяса бедренной мышцы кур - коды образцов 1-БМ, 2-БМ, 3-БМ; утки- У-БМ.

### *Выделение ДНК*

ДНК выделяли набором Сорб-ГМО-Б (ЗАО «Синтол», Россия) согласно инструкции.

### *Условия проведения ПЦР в реальном времени*

Праймеры и зонды, используемые в работе взяты из ГОСТ 31719 — 2012 и МР 4.2.0019 — 11.

Реакционная смесь объёмом 30 мкл содержала 2,5 мкл 10х ПЦР-буфера, 2,5 мкл  $MgCl_2$  концентрацией 2,5 мМ, 2,0 мкл dNTP, нуклеотиды в концентрации 25 мМ, SynTaq-полимеразы 2,5 ЕД, праймеры в концентрации 300 нМ и 2 мкл ДНК. Реактивы производства ЗАО «Синтол», Россия.

Режим амплификации: предварительная денатурация —  $95^\circ C$ , 420 с; отжиг-элонгация —  $60^\circ C$ , 40 с, денатурация —  $95^\circ C$ , 15 с, 45 циклов. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе АНК-32 (ЗАО «Синтол», Россия)

Постановку ПЦР проводили, используя десятикратное разведение исходной ДНК.

Статистическая обработка результатов ПЦР проводилась с использованием программного обеспечения, прилагающегося к АНК-32.

### *Исследование микроструктуры*

Исследование микроструктуры проводили в соответствии с ГОСТ 19496-2013 «Мясо и мясные продукты. Метод гистологического исследования». Изучение гистологических препаратов и их фотографирование осуществляли на световом микроскопе «AxioImaiger A1» (Carl Zeiss, Германия) с помощью подключенной видеокамеры «AxioCam MRc 5». Обработку изображений производили с применением компьютерной системы анализа изображений «AxioVision 4.7.1.0», адаптированной для гистологических исследований.

### **Результаты и обсуждение**

Для оценки пригодности метода с использованием видоспецифических праймеров к гену цитохрома Б для количественной оценки содержания ДНК была поставлена серия ее десятикратных разведений (Рис. 1)

Статистическая обработка полученных данных приведена на рис. 2.

Из рис. 1-2 видно, что кривые амплификации выходят с равным интервалом, характерным для десятикратных разведений, коэффициент корреляции составляет более 99,9 %, что является приемлемым значением для построения калибровочной кривой.

### *Sample collection*

Meat samples were ground with Retsch GM200 blade homogenizer. Three samples of  $50 \pm 1.0$  mg were selected from each muscle.

In the following coding of samples was used: chicken pectoral muscle samples, 1-PM, 2-PM, 3-PM; duck pectoral muscle sample, D-PM; chicken hip muscle samples, 1-HM, 2-HM, 3-HM; duck hip muscle sample, D-HM.

### *Isolation of DNA*

DNA was isolated by Sorb-GMO-B kit (Syntol CJSC, Russia) according to the instructions.

### *Conditions for real-time PCR*

Primers and probes used in this work were taken from GOST 31719-2012 and MP 4.2.0019-11.

The reaction mixture (30 ul) contained 2.5 ul of 10X PCR buffer, 2.5 ul of 2.5 mM  $MgCl_2$ , 2.0 ul of dNTP, nucleotides at a concentration of 25 mM, 2.5 U of SynTaq-polymerase, primers at a concentration of 300 nM, and 2 ul of DNA. The reagents are manufactured by Syntol CJSC, Russia.

Amplification mode: pre-denaturation —  $95^\circ C$ , 420 seconds; annealing-elongation —  $60^\circ C$ , 40 seconds; denaturation —  $95^\circ C$ , 15 seconds, 45 cycles. Real-time PCR was performed on a ANK-32 thermocycler (Syntol CJSC, Russia).

PCR amplification was performed using a tenfold dilution of the original DNA.

Statistical analysis of the PCR results was performed using the software supplied with ANK-32 thermocycler.

### *Microstructure research*

Microstructure research was performed in accordance with GOST 19496-2013 “Meat and meat products. Histological study method”. The study of histological slides and the photographs were performed on AxioImaiger A1 light microscope (Carl Zeiss, Germany) using the connected AxioCam MRc 5 camera. Image processing was performed using AxioVision 4.7.1.0 computer image analysis system adapted for histological studies.

### **Results and discussion**

To assess suitability of the method using species-specific primers for cytochrome B gene in order to quantify DNA content, serial tenfold dilutions of DNA were performed (Figure 1).

Statistical analysis of the data is shown in Figure 2.

Figures 1-2 show that the amplification curves are located at regular intervals, which are characteristic of tenfold dilutions. Correlation coefficient is more than 99.9%, which is an acceptable value for the calibration curve.

Дальнейшие измерения проводились в указанном диапазоне концентраций ДНК. Кривые амплификации образцов мяса кур и утки с использованием митохондриальных праймеров представлены на рис. 3–6.

Как видно из рис. 3–6 расхождения в кривых амплификации не превышают 1 порогового цикла, при этом в образцах 1 и 3 митохондриальной ДНК было немного больше в бедренных мышцах, в то время как в образцах 2 и 4 наоборот, ее было немного больше в грудных мышцах.

Сводные данные полученных значений порогового цикла изложены в табл. 2.

Из табл. 2 видно что среднее значение отклонения для образцов с положительным значением  $\Delta C_t$  составляет 0,41; а для образцов с отрицательным значением  $\Delta C_t$  составляет 0,49 что вполне укладывается в параметры

Further measurements were carried out at specified DNA concentration range. Amplification curves for samples of chicken and duck meat using mitochondrial primers are shown in Figures 3–6.

Figures 3–6 show that deviations in amplification curves do not exceed 1 threshold cycle. The mitochondrial DNA content for samples 1 and 3 was slightly higher in hip muscles while in samples 2 and 4, its content was slightly higher in pectoral muscles.

Summarized data for obtained threshold cycle values are shown in Table 2.

Table 2 shows that for samples with a positive  $\Delta C_t$  value mean deviation is 0.41 and for samples with a negative  $\Delta C_t$  value mean deviation is 0.49, which is well within the parameters of PCR method reproducibility. Based on these

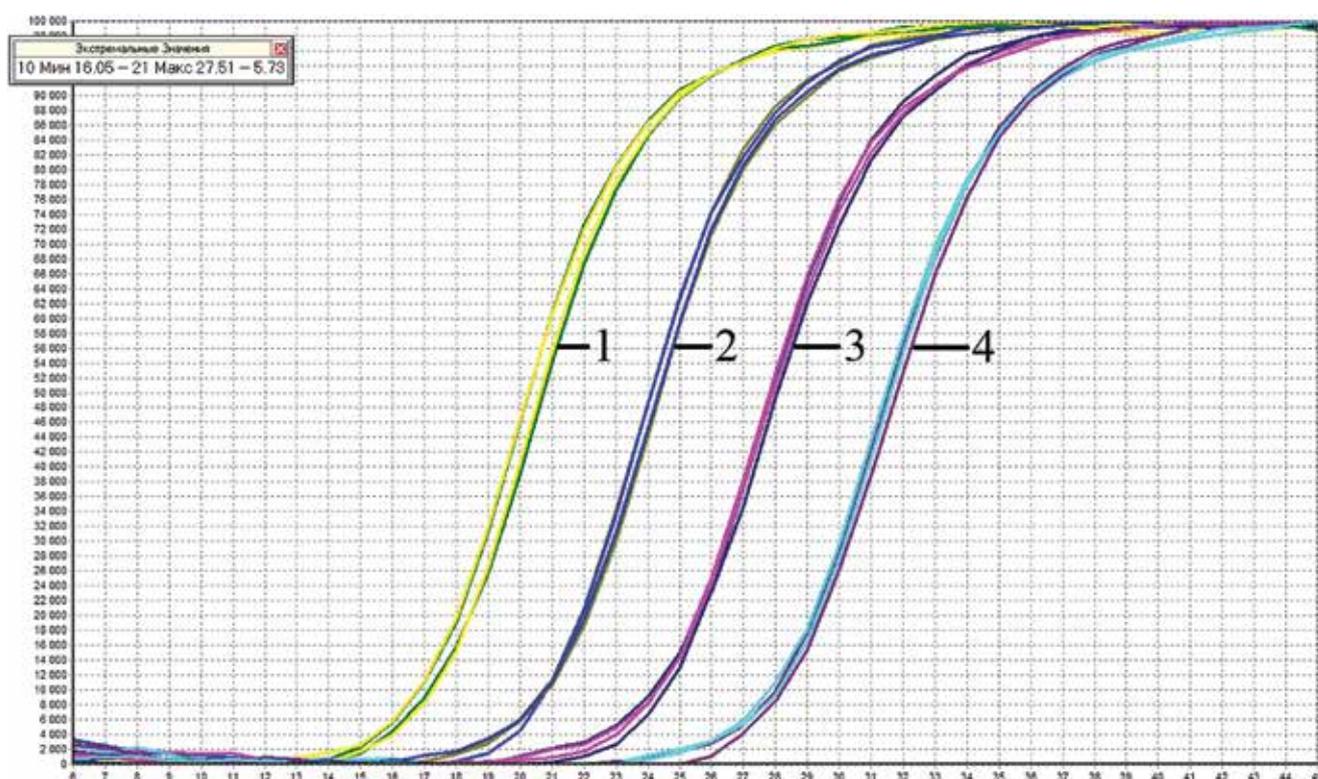


Figure 1. Amplification curves for tenfold dilutions of chicken DNA (1 — Chicken DNA, original, 2 — Chicken DNA,  $10^{-1}$  dilution, 3 — Chicken DNA,  $10^{-2}$  dilution, 4 — Chicken DNA,  $10^{-3}$  dilution)

Рис. 1. Кривые амплификации десятикратных разведений ДНК кур (1 — ДНК Курицы исходная, 2 — ДНК Курицы, разведение  $10^{-1}$ , 3 — ДНК Курицы, разведение  $10^{-2}$ , 4 — ДНК Курицы, разведение  $10^{-3}$ )

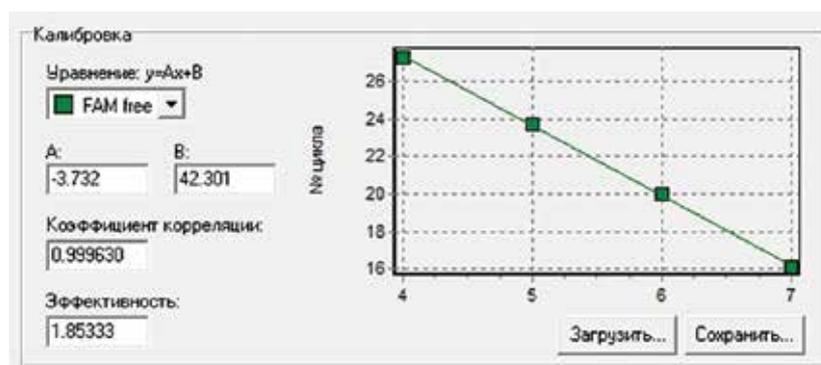


Figure 2. Calibration curve plotted according to  $C_t$  of chicken DNA tenfold dilutions.

Рис. 2. Калибровочная кривая, построенная по данным  $C_t$  десятикратных разведений ДНК кур.

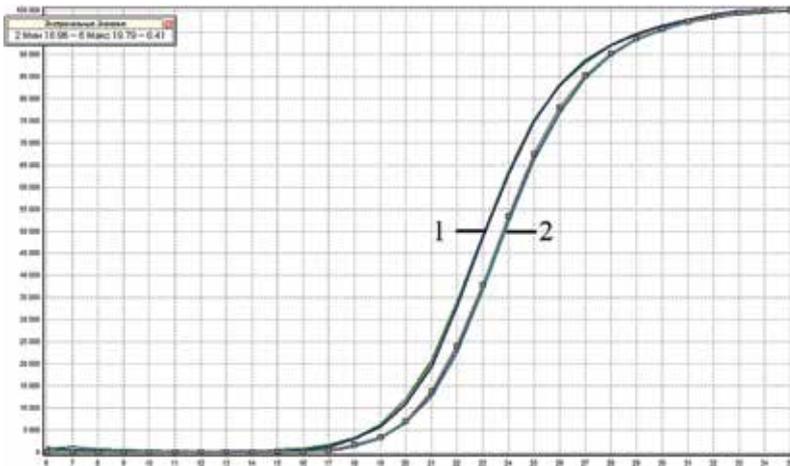


Figure 3. Amplification curves for DNA of 1-PM and 1-HM samples using mitochondrial primers (in triplicate)  
 1 — 1-HM  
 2 — 1-PM  
 Рис. 3 Кривые амплификации ДНК образцов 1-ГМ и 1-БМ с использованием митохондриальных праймеров (трехкратная повторность)  
 1 — 1-БМ  
 2 — 1-ГМ

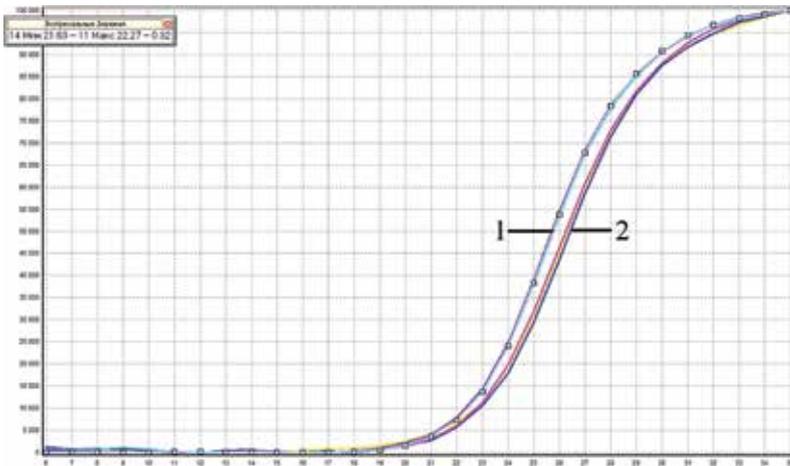


Figure 4. Amplification curves for DNA of 2-PM and 2-HM samples using mitochondrial primers (in triplicate)  
 1 — 2-PM  
 2 — 2-HM  
 Рис. 4 Кривые амплификации ДНК образцов 2-ГМ и 2-БМ с использованием митохондриальных праймеров (трехкратная повторность)  
 1 — 2-ГМ  
 2 — 2-БМ

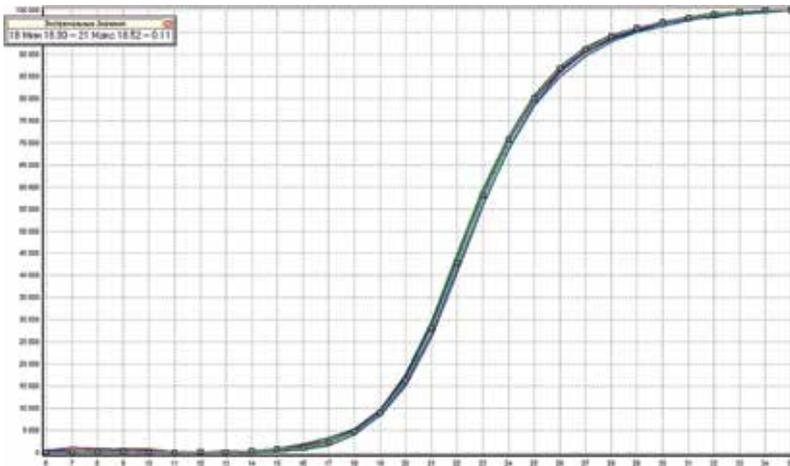


Figure 5. Amplification curves for DNA of 3-PM and 3-HM samples using mitochondrial primers (in triplicate)  
 Рис. 5. Кривые амплификации ДНК образцов 3-ГМ и 3-БМ с использованием митохондриальных праймеров (трехкратная повторность)

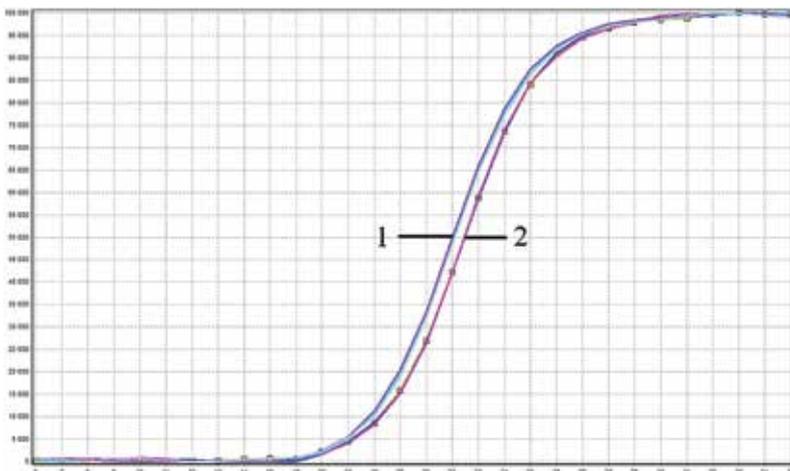


Figure 6. Amplification curves for DNA of D-PM and D-HM samples using mitochondrial primers (in triplicate)  
 1 — D-PM  
 2 — D-HM  
 Рис. 6 Кривые амплификации ДНК образцов У-ГМ и У-БМ с использованием митохондриальных праймеров (трехкратная повторность)  
 1 — У-ГМ  
 2 — У-БМ

Table 2. The values of threshold cycle Ct for amplified samples using mitochondrial primers

Табл. 2. Значения порогового цикла Ct амплифицированных образцов с использованием митохондриальных праймеров

Samples   Образцы	The values of threshold cycle Ct   Значения порогового цикла Ct			Mean   Среднее значение	$\Delta Ct$
	Increment sample 1   Точечная проба 1	Increment sample 2   Точечная проба 2	Increment sample 3   Точечная проба 3		
1-PM	19.73	19.79	19.70	19.74	+ 0.7
1-HM	18.96	19.06	19.09	19.04	
2-PM	21.66	21.63	21.70	21.64	- 0.53
2-HM	22.14	22.27	22.10	22.17	
3-PM	18.52	18.46	18.41	18.47	+ 0.13
3-HM	18.30	18.37	18.34	18.34	
D-PM	18.58	18.60	18.62	18.60	- 0.45
D-HM	18.24	18.03	18.19	18.15	

тры воспроизводимости ПЦР метода. Исходя из приведенных данных, можно сделать вывод, что в грудных и бедренных мышцах сельскохозяйственных птиц содержится равное количество митохондрий, что подтверждает наше изначальное предположение.

Геномная ДНК содержится в ядрах клеток, количество которых также зависит от типа ткани. В мышечных волокнах плотность ядер примерно одинаковая, в то время как в соединительной она может быть разная. При этом, в рыхлой волокнистой соединительной ткани плотность клеток выше, чем в мышечной. Опорные мышцы содержат значительно больше соединительной ткани, чем динамические мышцы, соответственно и плотность ядер клеток будет выше рис\_.

Площадь, занимаемая ядрами, относительно площади всего среза в бедренной группе мышц составляет 1,9%, в то время как в грудной группе мышц — 1,5%.

Кривые амплификации образцов мяса кур и утки с использованием геномных праймеров представлены на рис. 7–10.

Как видно из рис. 7–10 расхождения в кривых амплификации в отдельных образцах превышают 1 пороговый цикл, при этом максимальное различие отмечено в образцах мышечной ткани утки.

Сводные данные полученных значений порогового цикла изложены в табл. 3

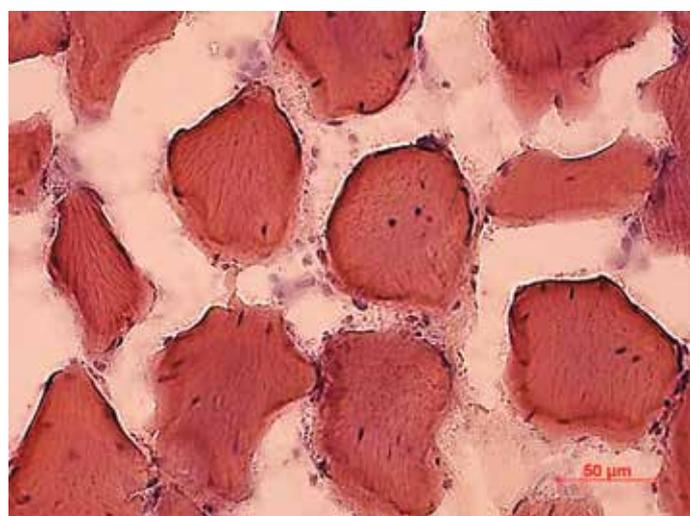


Figure 7. Microstructure of hip muscle tissue sample (x40)  
Рис. 7. Микроструктура образца мышечной ткани бедра (об. x40)

data, it can be concluded that poultry pectoral and hip muscles contain equal number of mitochondria. It confirms our initial assumption.

Genomic DNA is contained in the nuclei of cells, the number of which is also dependent on tissue type. In muscle fibers, the nuclei density is approximately equal, while in connective tissue, it can be different. Thus, in fibrous connective tissue, cell density is higher than in muscles. Supporting muscles contain significantly higher amount of connective tissue compared to dynamic muscles, respectively, the density of nuclei in such muscles is higher.

Relative to the total area of cut, the area occupied by the nuclei in hip muscle is 1.9%, while in pectoral muscle it is 1.5%.

Amplification curves for chicken and duck meat samples using genomic primers are shown in Figures 7–10.

Figures 7-10 show that deviations in amplification curves for individual samples exceed 1 threshold cycle. The maximum difference is noted for the samples of duck muscle tissue.

Summarized data for obtained threshold cycle values are shown in Table 3.

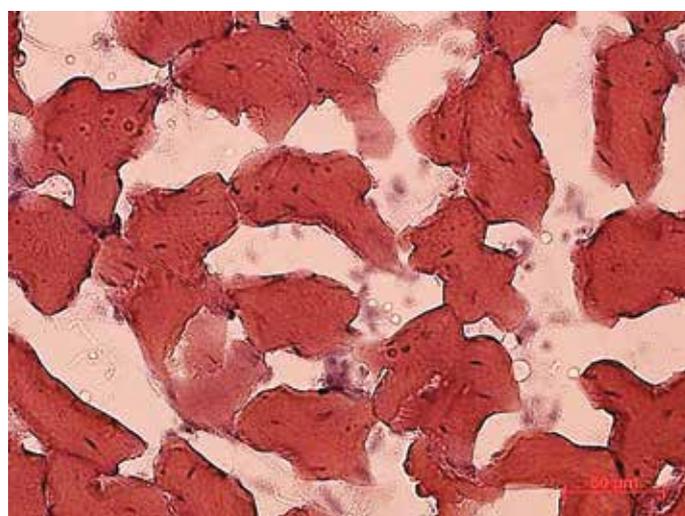


Figure 8. Microstructure of pectoral muscle tissue sample (x40)  
Рис. 8. Микроструктура образца мышечной ткани грудки (об. x40)

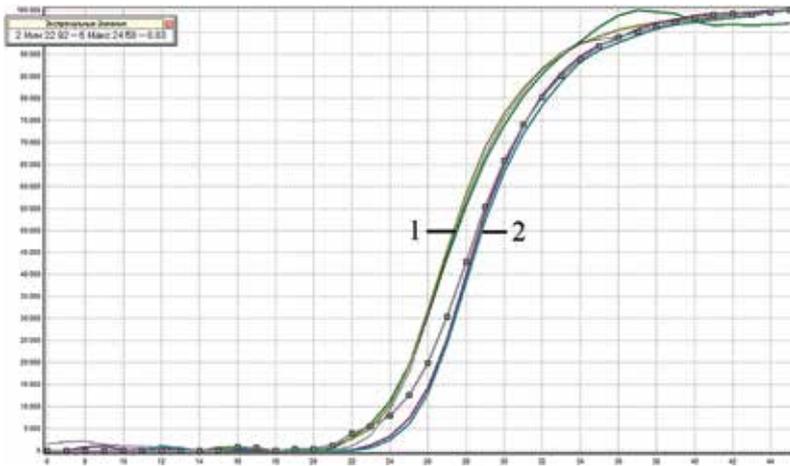


Figure 9. Amplification curves for DNA of 1-PM and 1-HM samples using genomic primers (in triplicate)

1 — 1-НМ

2 — 1-РМ

Рис. 9. Кривые амплификации ДНК образцов 1-ГМ и 1-БМ с использованием геномных праймеров (трехкратная повторность)

1 — 1-БМ

2 — 1-ГМ

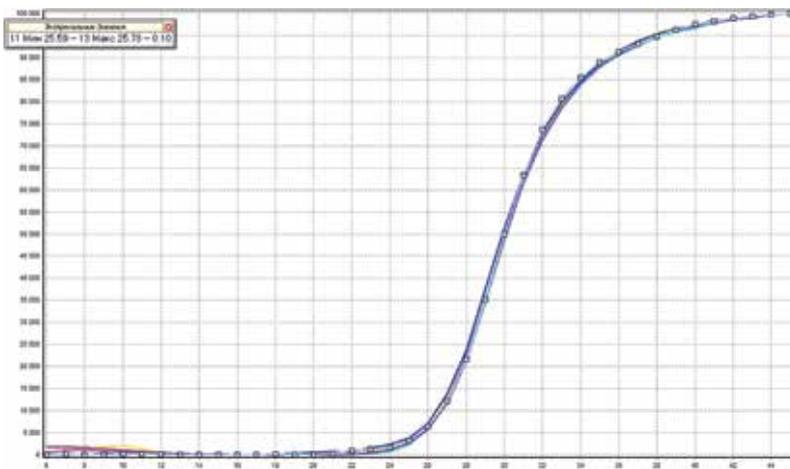


Figure 10. Amplification curves for DNA of 2-PM and 2-HM samples using genomic primers (in triplicate)

Рис. 10. Кривые амплификации ДНК образцов 2-ГМ и 2-БМ с использованием геномных праймеров (трехкратная повторность)

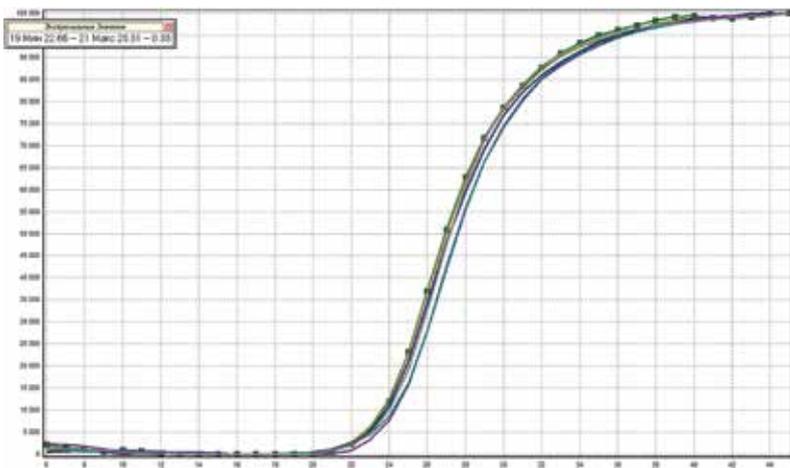


Figure 11. Amplification curves for DNA of 3-PM and 3-HM samples using genomic primers (in triplicate)

1 — 3 РМ

2 — 3 НМ

Рис. 11. Кривые амплификации ДНК образцов 3-ГМ и 3-БМ с использованием геномных праймеров (трехкратная повторность)

1 — 3 ГМ

2 — 3 БМ

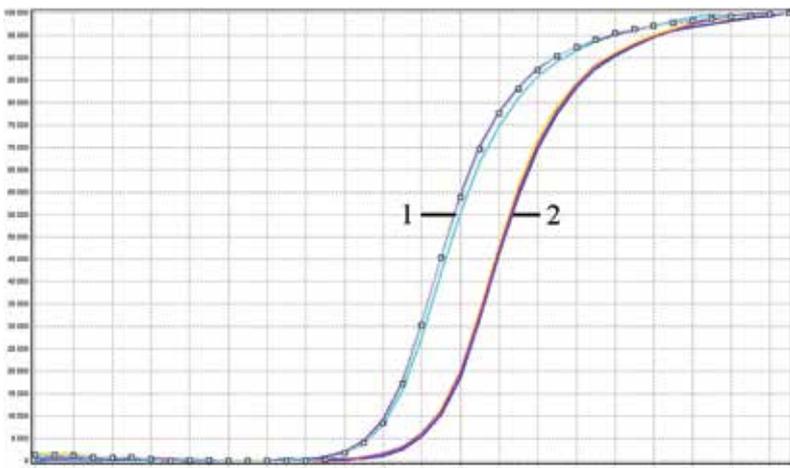


Figure 12. Amplification curves for DNA of D-PM and D-HM samples using genomic primers (in triplicate)

1 — D-РМ

2 — D-НМ

Рис. 12. Кривые амплификации ДНК образцов У-ГМ и У-БМ с использованием геномных праймеров (трехкратная повторность)

1 — У-ГМ

2 — У-БМ

Table 3. The values of threshold cycle Ct for amplified samples using genomic primers

Табл.3. Значения порогового цикла Ct амплифицированных образцов с использованием геномных праймеров

Samples   Образцы	The values of threshold cycle Ct   Значения порогового цикла Ct				$\Delta Ct$
	Increment sample 1   Точечная проба 1	Increment sample 2   Точечная проба 2	Increment sample 3   Точечная проба 3	Mean   Среднее значение	
1-PM	24.50	24.58	23.86	24.31	+ 1.3
1-HM	22.92	22.99	23.11	23.01	
2-PM	25.70	25.59	25.68	25.66	- 0.11
2-HM	25.78	25.76	25.78	25.77	
3-PM	23.31	23.29	23.00	23.20	+ 0.49
3-HM	22.70	22.66	22.78	22.71	
D-PM	23.35	23.16	23.21	23.24	- 2.92
D-HM	25.90	26.03	25.94	25.96	

Из табл. 3 видно среднее значение отклонения для образцов с положительным значением  $\Delta Ct$  составляет 0,89; а для образцов с отрицательным значением  $\Delta Ct$  составляет 1,51 что свидетельствует о нестабильности данной матрицы. Исходя из приведенных данных, можно сделать вывод, что не во всех случаях [3, 4] использование однокопийных генов в качестве матрицы для количественного анализа позволяет получить точный результат.

Следует отметить, что в работе Ballin N.Z. [4] изучалось соотношение количества митохондриальной и геномной ДНК в целях оптимизации метода количественного учёта соотношения мясных ингредиентов в сырье. В данной работе, в частности, было проведено сравнение количества митохондриальной ДНК различных пород свиней, что показало незначительную разницу в результатах амплификации. Однако как следует из полученных нами данных по мясу птицы, соотношение митохондриальной и геномной ДНК может варьироваться в различных тканях организма, что также следует учитывать при подобном походе. При этом, количество митохондриальной ДНК менее варьирует по тканям, в отличие от геномной ДНК, что соответствует нашим полученным результатам.

### Выводы

1. В грудных и бедренных мышцах сельскохозяйственных птиц содержится равное количество митохондрий.
2. Содержание геномной ДНК в равных навесках проб бедренных мышцах сельскохозяйственных птиц нестабильно.
3. Полученные в ходе проведения данной работы результаты позволяют сделать заключение, что для обоснования уровня технически неустраняемой примеси готовой мясной продукции мясом кур необходимо использовать праймеры, специфические к их митохондриальной ДНК.

### Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность с.н.с. Экспериментальной клиники-лаборатории биологически-активных веществ животного происхождения Пчёлкиной Виктории Викторовне за проведённые гистологические исследования.

Table 3 shows that for samples with a positive  $\Delta Ct$  value mean deviation is 0.89 and for samples with a negative  $\Delta Ct$  value mean deviation is 1.51, which indicates the instability of this matrix. Based on the data given, it can be concluded that the use of single-copy genes as a matrix for quantitative analysis allows obtaining accurate results only in some cases [3, 4].

It should be noted that Ballin N.Z. [4] studied the ratio of the amount of mitochondrial and genomic DNA in order to optimize the method of quantification of meat ingredients ratio in raw materials. In this study, in particular, a comparison was made of the amount of mitochondrial DNA for various pig breeds, which showed a slight difference in the results of amplification. However, data on poultry meat show that the ratio of mitochondrial and genomic DNA in different tissues may vary, which should also be taken into account in such approach. At the same time, the amount of mitochondrial DNA in different tissues is less variable, in contrast to genomic DNA, which corresponds to our results.

### Conclusion

1. Pectoral and hip muscles of poultry contain equal amount of mitochondria.
2. The content of genomic DNA in equal samples of poultry hip muscles is unstable.
3. The results obtained in this work allow to conclude that, to justify the level of technically non-removable chicken impurities in finished meat products, primers must be used, which are specific for their mitochondrial DNA.

### Acknowledgment

The authors express gratitude to the senior research scientist of Experimental clinic-laboratory of biologically active substances of animal origin, Pchelkina Victoria Viktorovna, for histological studies.

## REFERENCES | БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Porter C, Wall BT. Skeletal muscle mitochondrial function: is it quality or quantity that makes the difference in insulin resistance. *The Journal of Physiology* 2012 Dec 23; 590(23): 5935–5936.
2. Cole LW. The Evolution of Per-cell Organelle Number. *Frontiers in cell and developmental biology* 2016 Aug 18; 4: 85.
3. Cai Y, Li X, Lv R, et al.. Quantitative Analysis of Pork and Chicken Products by Droplet Digital PCR. *BioMed Research International* 2014 Aug 27; Volume 2014, Article ID 810209, 6 pages.
4. Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. PCR amplification of repetitive sequences as a possible approach in relative species quantification. *Meat Science* 2012; 90: 438–443.
5. Lakzadeh L, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS et al.. Application of PCR and SYBR Green QRTi-PCR Assays for the Identification and Quantification of Chicken Meat Under Different Cooking Conditions. *Food Biotechnology* 2013; 27:249–260.
6. Marchis D, Benedetto A, Amato G et al.. A quantitative real time polymerase chain reaction approach for estimating processed animal proteins in feed: preliminary data. *Italian Journal of Food Safety* 2013; 2:e4: 7–9.
7. Pegels N, González I, López-Calleja I et al. Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. *Poultry Science* 2012; 91 :1709–1719.
8. Martín B, Jofré A, Garriga M et al.. Rapid Quantitative Detection of *Lactobacillus sakei* in Meat and Fermented Sausages by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2006 Sept;72(9): 6040–6048.
9. Ghovvati S., Nassiri M.R, Mirhoseini S.Z. et al., Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* 2009; 20: 696–699.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

## Принадлежность к организации

**Минаев Михаил Юрьевич** — кандидат технических наук, руководитель ПЦР направления, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова

109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26

Тел.: +7-495-676-60-11

E-mail: mminaev@inbox.ru

**Солодовникова Галина Ивановна** — старший научный сотрудник ПЦР направления, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова

109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26

Тел.: +7-495-676-60-11

E-mail: 6766011@inbox.ru

**Курбаков Константин Андреевич** — младший научный сотрудник ПЦР направления, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова

109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26

Тел.: +7-495-676-60-11

E-mail: homo\_ludens@vniimp.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 08.02.2017

## AUTHOR INFORMATION

## Affiliation

**Minaev Mikhail Yurievich** — candidate of technical sciences, a head of the Molecular diagnostic division, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel: +7-495-676-60-11

E-mail: mminaev@inbox.ru

**Solodovnikova Galina Ivanovna** — senior research scientist of the Molecular diagnostic division, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel: +7-495-676-60-11

E-mail: 6766011@inbox.ru

**Kurbakov Konstantine Andreevich** — junior research scientist of the Molecular diagnostic division, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel: +7-495-676-60-11

e-mail: homo\_ludens@vniimp.ru

## Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 08.02.2017

# COMPARATIVE DYNAMICS OF PROTEIN DESTRUCTION IN CANNED FOODS IN SAUCE AT DIFFERENT THERMAL TREATMENT REGIMES AND SUBSEQUENT STORAGE

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИНАМИКА ДЕСТРУКЦИИ БЕЛКОВ КОНСЕРВОВ В СОУСЕ ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ТЕПЛООВОЙ ОБРАБОТКИ И ПОСЛЕДУЮЩЕМ ХРАНЕНИИ

Krylova V.B., Gustova T.V.

The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute, Moscow, Russia

**Ключевые слова:** консервы, пастеризация, белок, деструкция.

**Keywords:** canned foods, pasteurization, protein, destruction.

### Аннотация

На предприятиях мясной промышленности, где осу В ходе исследований установлены структурные изменения белков, связанные как с предварительной обработкой мясных ингредиентов, уровнем рН системы, так и с параметрами тепловой обработки.

Режимы пастеризации позволили сохранить долю белкового азота до 94% к концу срока хранения консервов. При стерилизации потери белкового азота в 2 раза выше. Установлено отрицательное действие более кислого соуса на сохранность белковой фракции азота консервов.

Накопление пептидной фракции азота в консервах в томатном соусе после пастеризации в 2 раза интенсивнее. В стерилизованных консервах интенсивнее процессы накопления низкомолекулярных азотистых соединений, что свидетельствует о глубине деструкции белковой и пептидной фракции азота. Показано, что накопление амино-амиачного азота в процессе хранения консервов в среднем составило 12,4% вне зависимости от рН используемых соусов и вида тепловой обработки.

Отмечено смещение величины рН консервов в кислую сторону при пастеризации, причем степень смещения в консервах томатном соусе в 2,5 раза выше по отношению к величине рН для консервов в сметанном соусе. При стерилизации консервов имела место иная динамика величин рН: в консервах в томатном соусе величина рН снизилась на 0,39 единицы, а в консервах в сметанном соусе выросла на 0,22 единицы. В процессе хранения выявлена тенденция более интенсивного снижения рН в консервах в томатном соусе после пастеризации по отношению к консервам, подвергшихся стерилизации. Иной характер динамики величины рН в консервах в сметанном соусе: отмечено не значительное, на 0,7%, увеличение рН к концу срока хранения в пастеризованных консервах и значительное снижение, на 8,4%, в стерилизованных консервах.

### Введение

Известно, что обработка высокой температурой может оказывать на пищевую ценность продуктов как позитивное, так и негативное воздействие. Например, белок бобовых культур после тепловой обработки усваивался организмом лучше вследствие инактивации ингибитора трипсина, замедляющего переваривание [1]. Примером негативного воздейст-

### Abstract

In the course of investigations, the structural changes in proteins were established, which were associated with the preliminary treatment of meat ingredients, a pH level of the system and parameters of thermal treatment.

The pasteurization regimes allowed retaining a protein nitrogen proportion up to 94% by the end of canned food storage duration. Upon sterilization, the losses in protein nitrogen were two times higher. A negative effect of more acidic sauce on preservation of the protein nitrogen fraction in canned foods was established.

An accumulation of the peptide nitrogen fraction in the canned foods in tomato sauce after pasteurization was two times more intensive. In the sterilized canned foods, the processes of accumulation of the low molecular weight nitrogenous compounds were more intensive, which suggests a depth of destruction of the protein and peptide nitrogen fraction. It was shown that an accumulation of amino-ammonia nitrogen during canned food storage was on average 12.4% irrespective of the pH value in the used sauces and the type of thermal treatment.

A shift in the pH value of the canned foods toward the acid side upon pasteurization was noticed. With that, a degree of the shift in the canned foods in tomato sauce was 2.5 times higher than the pH value of the canned foods in sour cream sauce. When sterilizing canned foods, another dynamics of the pH values was observed: a pH value declined by 0.39 units in the canned foods in tomato sauce and grew by 0.22 units in the canned foods in sour cream sauce. During storage, the tendency of more intense pH decline was revealed for the canned foods in tomato sauce after pasteurization compared to the canned foods after sterilization. Another character of the pH value dynamics was found in the canned foods in sour cream sauce: an insignificant increase (by 0.7%) of the pH value in the pasteurized canned foods and a significant decrease (by 8.4%) in the sterilized canned foods were observed by the end of storage.

### Introduction

It is known that high temperature processing can have either a negative or positive effect on a product nutritive value. For instance, legume protein was digested better by the human body after thermal treatment due to inactivation of the trypsin inhibitor, which retards digestion [1]. An example of a negative impact of product thermal treat-

вия тепловой обработки продуктов могут служить данные о снижении содержания витамина  $B_1$ , например в стерилизованных паштетах, на 50% и  $B_2$  — на 52,7% [2]. Известно, что изменения белков носят разнонаправленный характер и зависят от температуры тепловой обработки, ее продолжительности, вида мяса, способа предварительной обработки ингредиентов и т.д. Исследования данного научного направления были начаты в 50-х годах прошлого века. В.Н. Орехович [3] и Белицер В.А. [4] рассматривали денатурацию белка как кооперативный процесс распада молекулы на составные части, т.е. денатурация белков представляла собой процесс дезорганизации структуры белковых молекул, в результате чего они становились более рыхлыми и открытыми для влияния других факторов. Е.В. Jensen и соавторы [5] считали, что в процессе агрегации или коагуляции белка при тепловой обработке связь между молекулами осуществлялась благодаря, связям, образованным между карбоксильными группами и аминогруппами соседних полипептидных цепей. Известно, что температуры, при которых происходит денатурация разных фракций белков мяса, существенно различаются. Так денатурация глобулярных белков (актин, миозин, актомиозин) начиналась при температуре 45–50 °С, а при достижении 60 °С процессу подверглось уже около 90% молекул белков [6]. Альбумин полностью денатурировал при 60 °С, а при 70–80 °С денатурировали все мышечные белки мяса. Вследствие частичного гидролитического расщепления белков имело место увеличение числа свободных  $NH_2$ - и  $COOH$ -групп, а развивающийся при определенной их концентрации процесс коагуляции характеризовался последовательным уменьшением числа свободных  $NH_2$ - и  $COOH$ -групп [7–10].

Основную долю рынка разных ассортиментных групп консервов составляют стерилизованные консервы. На сегодняшний день характер трансформаций белков, жиров и полисахаридов мясных и мясорастительных консервов при их производстве и последующем хранении изучен нами достаточно глубоко [11–14]. Актуальной задачей сегодняшнего дня является разработка щадящих режимов научно обоснованной технологии тепловой обработки консервов, которая позволит производителю изготавливать продукцию с высокими органолептическими и физико-химическими показателями и при этом существенно сократить затраты энергоресурсов на производство. Проведенные ранее работы показали, что разработка рациональных режимов стерилизации мясных кусковых консервов из говядины привела к очень незначительному снижению массовых долей незаменимых и заменимых аминокислот (на 4,4–5,3%) и росту аминокислотного азота (на 1,6%) [15]. Следовательно, в качестве щадящей тепловой обработки эффективно применим процесс пастеризации консервов.

ment can be the data on a decrease in the content of vitamin  $B_1$  by 50% and  $B_2$  by 52.7% in the sterilized pates [2]. It is known that changes in proteins have a diverse character and depend on a thermal treatment temperature, its duration, a meat type, a method of preliminary treatment of ingredients and so on. Studies in this scientific direction were begun in the 1950s. V.N. Orekhovich [3] and V.A. Belitser [4] regarded protein denaturation as a complex process of molecular disintegration on constituents, i.e., the denaturation process represented a process of disorganization of the protein molecular structure; as a result, they became looser and open to an influence of other factors. E.V. Jensen et al. [5] suggested that in the process of protein aggregation and coagulation at thermal treatment, the bonds between molecules existed due to the bonds formed between the carboxyl groups and amino groups of adjacent polypeptide chains. It is known that temperatures, at which denaturation of different meat protein fractions occurs, are significantly different. For example, denaturation of globular proteins (actin, myosin, actomyosin) began at a temperature of 45–50 °C, and at a temperature of 60 °C, about 90% of protein molecules underwent the process [6]. Albumin was completely denatured at 60 °C, and at 70–80 °C, all muscle proteins were denatured. Due to partial hydrolytic breakdown of proteins, the number of free  $NH_2$ - and  $COOH$ -groups increased and a coagulation process that developed at their specific concentration was characterized by a steady decrease in the number of free  $NH_2$ - and  $COOH$ -groups [7–10].

The main share in the market of various assortment groups of canned foods is occupied by sterilized canned foods. Up to date, we have quite comprehensively studied the character of protein, fat and polysaccharide transformation in meat and meat-and-plant canned foods upon their production [11–14]. Currently, a topical task is the development of gentle regimes of scientifically substantiated technology for canned food thermal treatment, which will allow a producer to manufacture products with high organoleptic and physico-chemical indicators and, at the same time, significantly reduce energy consumption in production. The earlier research showed that the development of rational sterilization regimes for canned beef in pieces led to a very insignificant reduction in the mass fractions of essential and non-essential amino acids (by 4.4–5.3%) and an increase in amino-ammonia nitrogen (by 1.6%) [15]. Therefore, a pasteurization process of canned foods can be effectively used as a gentle thermal treatment.

Глубокие научные работы по технологии производства пастеризованных консервов в России относятся к началу 90-х годов прошлого века и касаются узкого ассортимента консервов, а именно ветчинных изделий. Учитывая возрастающую тенденцию к производству продуктов питания стабильных по пищевой и биологической ценностям, прошедших минимальную тепловую обработку и сохранившим высокие органолептические характеристики, все большее значение принимают исследования по совершенствованию технологии консервированных обеденных блюд с мясом и соусом.

Цель настоящей работы — исследование сравнительной динамики деструктивных изменений белка пастеризованных и стерилизованных консервов «Мясо в соусе» при производстве и в процессе хранения.

### Материалы и методы

Объектами исследований служили опытные образцы консервов «Мясо в соусе»:

ИКП — консервы пастеризованные «Мясо в томатном соусе»;

ИКС — консервы стерилизованные «Мясо в томатном соусе»;

2БП — консервы пастеризованные «Мясо в сметанном соусе»;

2БС — консервы стерилизованные «Мясо в сметанном соусе».

Консервы были изготовлены из предварительно обжаренной говядины с массовой долей жировой и соединительной тканей не более 14%, измельченной на кусочки массой 30–50 г. Массовая доля кусочков мяса — 40%, соуса — 60%. В состав томатного соуса входили морковь и лук репчатый пассерованные, корень петрушки, томатная паста, мука пшеничная, кунжутные семечки, соль поваренная, сахар-песок, перец черный молотый и вода. В состав сметанного соуса — сметана, мука пшеничная, соль поваренная, перец черный молотый, орех мускатный молотый и вода. Консервы были изготовлены в полимерной банке массой нетто 140 г по двум опытным режимам при равной продолжительности стадий собственно пастеризации или стерилизации:

— 1 режим — пастеризация при температуре 100 °С;

— 2 режим — стерилизация при температуре 120 °С.

Соусы, использованные при производстве исследуемых образцов консервов, отличались значениями pH: томатный соус с pH=4,4, сметанный с pH=5,0.

В работе использованы следующие методы определения:

— величины pH — методом измерения разности электрических потенциалов между стеклянным электродом и электродом сравнения, помещенными в образец продукта;

— содержания аминок-аммиачного азота (ААА), основанным на связывании аминок-аммиачной группы и аммиака

Comprehensive studies on pasteurized canned meat technologies were carried out at the beginning of the 1990s and included a narrow canned food range, namely, ham products. Taking into consideration an increasing trend towards manufacturing foods that are stable in terms of the nutritive and biological value, underwent minimal thermal treatment and retained high organoleptic characteristics, studies on improvement of a technology for canned dinner dishes with meat and sauce are becoming more and more important.

The aim of the present work is to study the comparative dynamics of protein destructive changes in the pasteurized and sterilized canned foods “Meat in sauce” in production and during storage.

### Materials and methods

The subjects of the research were the experimental samples of canned foods “Meat in sauce”:

1PCF — pasteurized canned foods “Meat in tomato sauce”;

1SCF — sterilized canned foods “Meat in tomato sauce”;

2PCF — pasteurized canned foods “Meat in sour cream sauce”;

2SCF — sterilized canned foods “Meat in sour cream sauce”.

The canned foods were made from preliminarily roasted beef with a mass fraction of the fatty and connective tissues not more than 14% and cut into pieces with a weight of 30–50 g. Mass fractions of meat and sauce were 40% and 60%, respectively. The tomato sauce included sautéed carrot and onion, parsley root, tomato paste, wheat flour, sesame seeds, table salt, granulated sugar, powdered black pepper and water. The sour cream sauce included sour cream, wheat flour, table salt, powdered black pepper, powdered nutmeg and water. Canned foods were produced in a polymer container with a weight of 140 g under two experimental regimes with the same duration of the pasteurization and sterilization stages:

— 1 regime: pasteurization at a temperature of 100 °С;

— 2 regime: sterilization at a temperature of 120 °С.

Sauces used in production of the canned food samples under investigation differed in the pH values: pH=4.4 (the tomato sauce), and pH=5.0 (the sour cream sauce).

The analyses were carried out using the following methods:

— pH value — the method of measuring the potential differences between the glass electrode and the reference electrode inserted into a product sample;

— amino-ammonia nitrogen (AAN) content — the method based on binding of amino groups and ammonia by

формальдегидом в нейтральной среде с последующим титрованием щелочью карбоксильных групп, количество которых эквивалентно количеству свободных аминогрупп;

- содержания фракций азота — методами, основанными на способности белковых веществ осаждаться под действием различных реагентов. Белковый азот осаждали трихлоруксусной кислотой с последующей минерализацией осадка и определением азота в нем по методу Кьельдаля. Пептидный азот определяли по разности между азотом, осаждаемым фосфорновольфрамовой кислотой и азотом, осаждаемым трихлоруксусной кислотой. Количество остаточного азота представляло собой разницу между количеством общего азота и количеством белкового и пептидного.

Обработку экспериментальных данных проводили методами математической статистики. Повторность опытов трехкратная. Гипотезы проверяли с уровнем доверительной вероятности 0,95.

В MS Excel аппроксимацию экспериментальных данных осуществляли путем построения их графика с последующим подбором подходящей аппроксимирующей функции.

### Результаты и обсуждение

В процессе тепловой обработки консервов и последующих структурных изменений белков, разрыва прежних и образования новых связей при участии водородных связей, сульфгидрильных, дисульфидных, кислых и основных групп белков и гидрофобных взаимодействий имеют место изменения физико-химических показателей продукции, в том числе и величины рН. Динамика величин рН после производства и при хранении консервов приведена на рисунке 1.

formaldehyde in the neutral environment with the following titration with alkaline of the carboxyl groups, which quantity is equivalent to the quantity of free amino acids;

- nitrogen fraction content — the methods based on the ability of the protein substances to precipitate under the action of different reagents. Protein nitrogen was precipitated with trichloroacetic acid with the following mineralization of a precipitate and detection of nitrogen by the Kjeldahl method. Peptide nitrogen was determined by the difference between nitrogen precipitated with phospho-wolframic acid and nitrogen precipitated with trichloroacetic acid. An amount of residual nitrogen is the difference between an amount of the total nitrogen and an amount of protein and peptide nitrogen.

The experimental data were processed by the methods of mathematical statistics. The experiment was carried out in triplicate. The hypotheses were verified with probability of 0.95.

Approximation of the experimental data was carried out in MS Excel by building a graph with the subsequent selection of a suitable approximating function.

### Results and discussions

Changes in the physico-chemical indicators of products including a pH value occur in the process of canned food thermal treatment and subsequent structural changes in proteins, disruptions of the initial and formation of new bonds with participation of the hydrogen bonds, sulfhydryl, disulfide, acidic and basic protein groups and hydrophobic interactions. The dynamics of the pH values after production and during storage of the canned foods is given in Fig. 1.

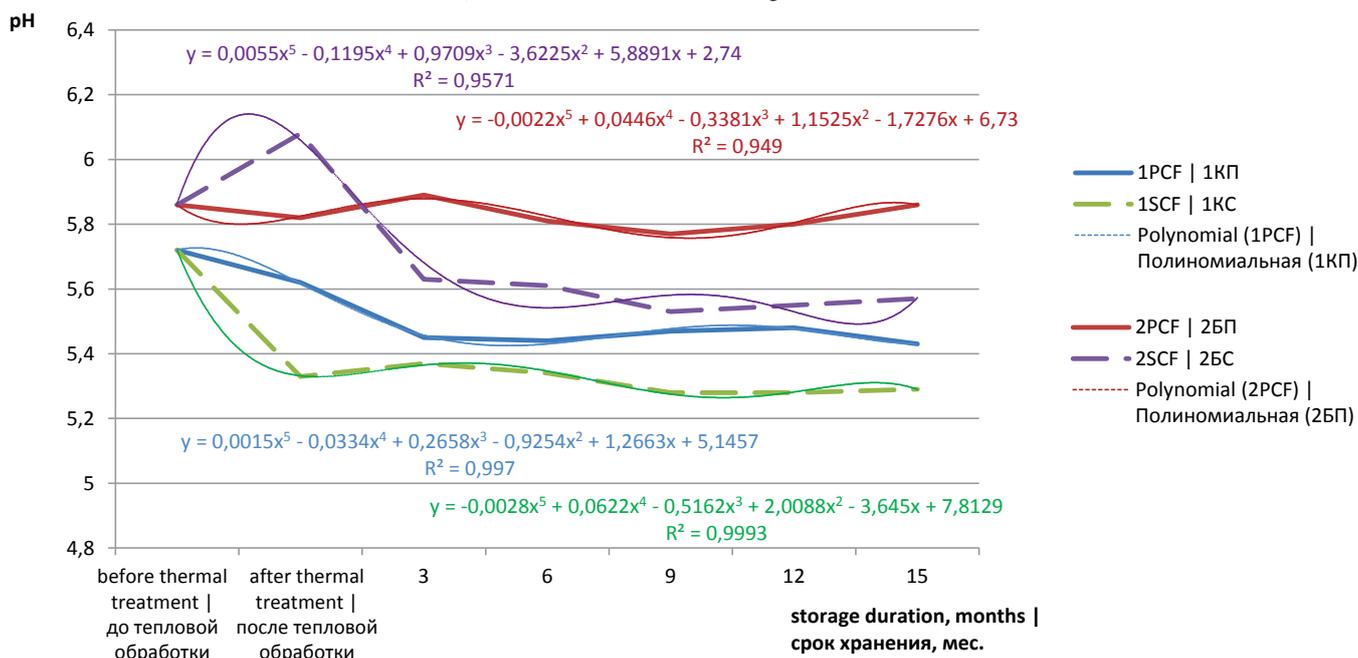


Figure 1. pH value dynamics after production and during storage of canned foods  
Рис. 1. Динамика значений рН после производства и при хранении консервов

Подготовленные для фасования в банки рецептурные смеси консервов до тепловой обработки имели следующие величины рН: 5,72 — «Мясо в томатном соусе» и 5,86 — «Мясо в сметанном соусе».

Известно, что степень денатурирующего воздействия тепла на составляющие пищевой ценности продукта зависит от условий, в которых происходит тепловая обработка. Так, пастеризация консервов привела к смещению величины рН в кислую сторону, причем для консервов в томатном соусе степень смещения в 2,5 раза интенсивнее, чем в консервах в сметанном соусе. При стерилизации консервов имела место иная динамика величин рН: в консервах в томатном соусе величина рН снизилась на 0,39 единицы, а в консервах в сметанном соусе выросла на 0,22 единицы. Можно предположить, что это связано с разной степенью увеличения числа свободных  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ - групп при пастеризации и стерилизации консервов с разной исходной величиной рН.

В процессе хранения величины рН консервов несколько стабилизировались и после 15 месяцев составили:

- в пастеризованных консервах «Мясо в томатном соусе» — 5,43, что на 3,4% ниже по отношению к соответствующему значению сразу после пастеризации;
- в стерилизованных консервах «Мясо в томатном соусе» — 5,29, что на 0,75% ниже к значениям после производства;
- в пастеризованных консервах «Мясо в сметанном соусе» — 5,86, что на 0,7% выше по отношению к значению сразу после пастеризации;
- в стерилизованных консервах «Мясо в сметанном соусе» — 5,57 — после стерилизации, что на 8,4% ниже соответствующих значений после производства.

На рисунках 2 и 3 приведены кривые изменения содержания фракций азотистых веществ продукта после производства и в процессе хранения. Анализ приведенных данных показал наличие деструктивных изменений белковой составляющей пастеризованных и стерилизованных консервов после производства и в процессе хранения. При этом интенсивность потерь общего азота при более высоких температурах стерилизации согласуется с данными А.А. Соколова и М. Кемаль [16], отметившими, что степень изменения содержания общего азота в мясе возрастала с увеличением температуры и продолжительности нагревания консервируемого продукта.

Воздействие температуры пастеризации и последующее хранение исследуемых консервов в течение 15 месяцев снизило массовую долю общего азота в среднем на 5%. Такие изменения содержания общего азота лежат в диапазоне ошибки опыта, особенно учитывая неоднородность соотношения видов тканей в кусочках мяса. Снижение массовой доли общего азота в консервах, прошедших стерилизацию, составило в среднем 6,6%.

The canned food recipe mixtures prepared for filling into containers had the following pH values before thermal treatment: 5.72 in “Meat in tomato sauce” and 5.86 in “Meat in sour cream sauce”.

It is known that a degree of heat denaturation effect on constituents of a product nutritive value depends on conditions of thermal treatment. For example, canned food pasteurization led to a shift in the pH value toward the acid side with a shift degree 2.5 times more intensive in the canned foods in tomato sauce compared to the canned foods in sour cream sauce. Another dynamics of the pH values was observed upon canned food sterilization: in the canned foods in tomato sauce, the pH value declined by 0.39 units and in the canned foods in sour cream sauce it increased by 0.22 units. It can be suggested that this was associated with a different degree of an increase in free  $\text{NH}_2$ - and  $\text{COOH}$ - groups upon pasteurization and sterilization of the canned foods with different initial pH values.

During storage, the pH values of canned foods somewhat stabilized and after 15 months were:

- 5.43 in the pasteurized canned foods “Meat in tomato sauce”, which was 3.4% lower compared to the corresponding value immediately after pasteurization;
- 5.29 in the sterilized canned foods “Meat in tomato sauce”, which was 0.75% lower compared to the values after production;
- 5.86 in the pasteurized canned foods “Meat in sour cream sauce”, which was 0.7% higher compared to the value immediately after pasteurization;
- 5.57 in the sterilized canned foods “Meat in sour cream sauce”, which was 8.4% lower compared to the corresponding values after production.

Fig. 2 and 3 present the curves for changes in the content of nitrogenous substance fractions in a product after production and during storage. Analysis of the obtained data showed a presence of the destructive changes in the protein constituent of the pasteurized and sterilized canned foods after production and during storage. With that, an intensity of the total nitrogen loss at higher temperatures corresponds to the data of A.A. Sokolov and M. Kemal [16], who pointed out that a degree of changes in the total nitrogen content in meat increased in the canned foods with the rise of temperature and heating duration.

An impact of the pasteurization temperature and subsequent storage of the studied canned foods for 15 months reduced the mass fraction of total nitrogen on average by 5%. These changes in the total nitrogen content are in a range of an experiment error, especially, taking into consideration the heterogeneity of the ratio of tissue types in meat pieces. A decrease in the total nitrogen mass fraction in the canned foods that underwent sterilization was on average 6.6%.

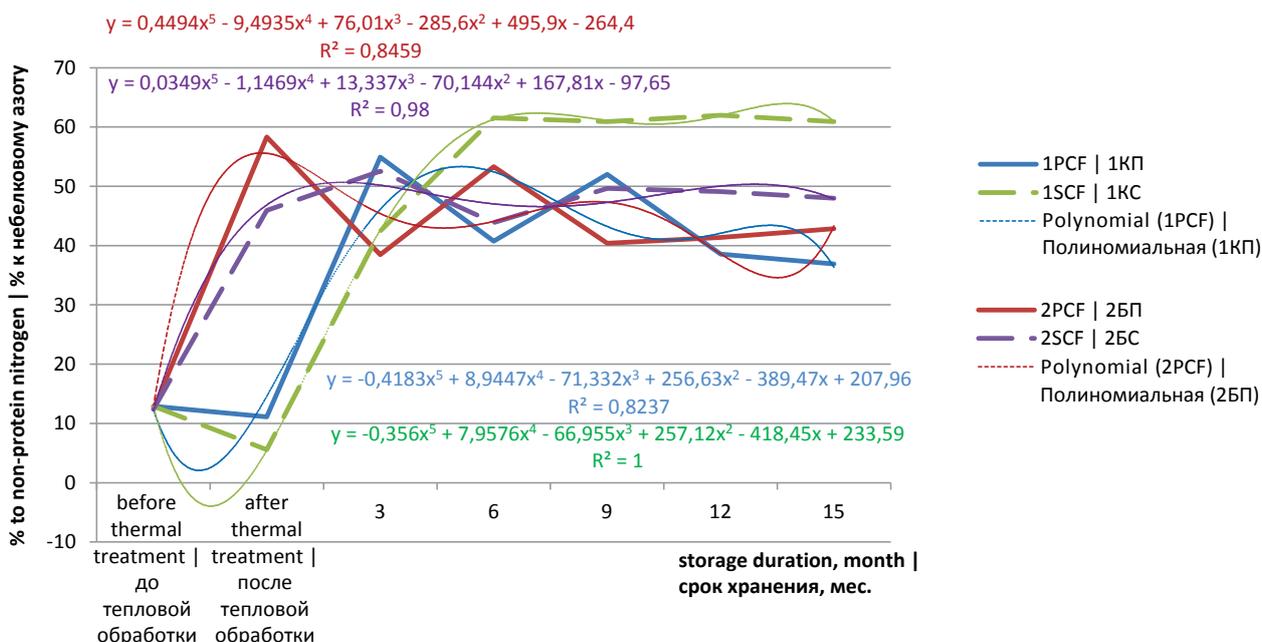


Figure 2. Dynamics of the peptide nitrogen fraction after production and during storage of canned foods  
Рис. 2. Динамика пептидной фракции азота после производства и при хранении консервов

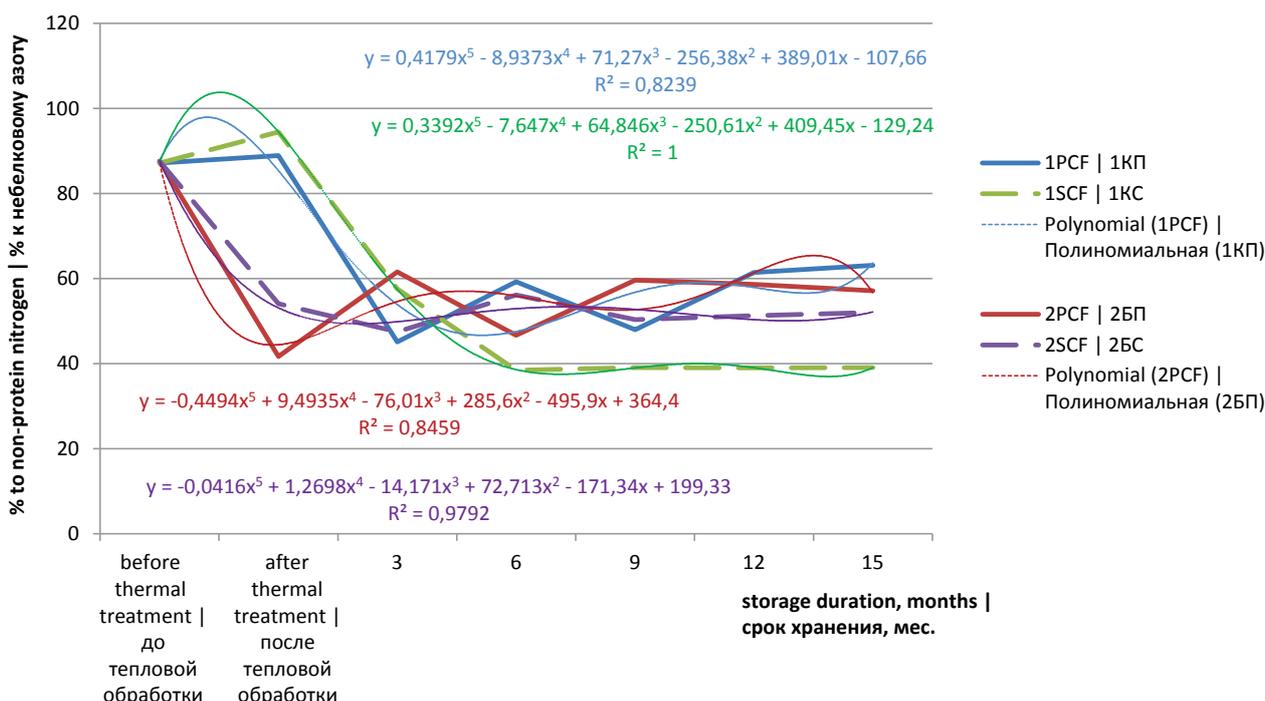


Figure 3. Dynamics of the residual nitrogen fraction after production and during storage of canned foods  
Рис. 3. Динамика остаточной фракции азота после производства и при хранении консервов

Отмечена тенденция уменьшения содержания белкового азота, что связано, в том числе, и с предварительной кратковременной обжаркой мясного сырья. Снижение уровня белкового азота в пастеризованных консервах менее заметно и в среднем составило 5,2% по истечению 15 месяцев хранения по отношению к данным после пастеризации. Для стерилизованных консервов средние значения данного показателя в два раза выше, т.е. снижение величины белкового азота составило 10,1%.

A tendency towards a reduction in the protein nitrogen content was observed, which was associated, among other things, with preliminary short-term roasting of meat raw material. A decrease in the level of protein nitrogen in the pasteurized canned foods was less evident and was on average 5.2% after storage for 15 months relative to the data after pasteurization. For sterilized canned foods, the average values of this indicator were two times higher, i.e., a reduction in protein nitrogen was 10.1%.

Динамика накопления пептидного азота в пастеризованных и стерилизованных консервах также различна. Например, в консервах в томатном соусе после пастеризации отмечено накопление пептидной фракции азота в 2 раза интенсивнее, чем в тех же консервах, но прошедших стерилизацию. Одновременно, накопление низкомолекулярных азотистых соединений выше в этих же образцах, но стерилизованных. Аналогичная динамика пептидной фракции азота была отмечена в консервах в сметанном соусе (рис. 2–3). Полученные результаты полностью согласуются с материалами А.А. Соколова [17, 18], при повышении температуры и увеличении продолжительности нагревания мяса скорость распада полипептидов возрастает значительно более интенсивно, чем скорость распада белковых веществ.

В процессе хранения пастеризованных консервов продолжались деструктивные процессы, при этом степень проявления деструкции белков зависела от рН используемого соуса (рис. 2–3). Так для консервов «Мясо в томатном соусе» можно выделить три периода хранения:

- первый период — по 6 месяцев хранения — характеризовался снижением массовой доли пептидной фракции на 14,2% за счет деструкции пептидов сырья и пептидов, образовавшихся при тепловой обработке консервов, при росте в равном количестве фракции остаточного азота;
- второй период — с 6 по 9 месяцев хранения — отмечен ростом массовой доли пептидного азота на 11,3% за счет разрушения белковой составляющей консервов при снижении доли остаточного азота в равном количестве;
- третий период — с 9 по 15 месяцев — характеризовался плавной деструкцией пептидной фракции азота на 15,1% и соответствующим приростом массовой доли остаточного азота.

В консервах «Мясо в сметанном соусе» отмечено два периода:

- первый период — по 6 месяцев хранения — характеризовался увеличением массовой доли пептидной фракции азота на 14,9% за счет разрушения белковой составляющей консервов при снижении доли остаточного азота в равном количестве;
- второй период с 6 по 15 месяцев хранения — отмечен снижением доли пептидного азота на 10,5% за счет его глубокой деструкции при увеличении остаточного в равном количестве.

В процессе хранения стерилизованных консервов в динамике пептидной и остаточной фракций азота отмечены два принципиально различных периода: первый — до 6 месяцев, второй — с 6 по 15 месяцев хранения. Первый период для консервов «Мясо в томатном соусе» характеризовался приростом на 19,1% массовой доли фракции пептидного азота за счет деструктивных процессов в белковой составляющей при снижении в равном количестве остаточной фракции азота. В кон-

The dynamics of the peptide nitrogen accumulation was also different in the pasteurized and sterilized canned foods. For example, in the canned foods in tomato sauce after pasteurization, an accumulation of the peptide nitrogen fraction was twice as intensive as in the same canned foods but underwent sterilization. At the same time, an accumulation of the low molecular weight nitrogenous compounds was higher in the same samples but sterilized. Similar dynamics was observed in the canned foods in sour cream sauce (Fig. 2–3). The obtained data fully corresponds to the data of A.A. Sokolov [17,18]: with temperature rise and storage duration extension, the rate of polypeptide breakdown increases much more intensive than the rate of protein substance breakdown.

The destruction processes persisted during storage of the pasteurized canned foods; with that, a degree of manifestation of protein destruction depended on the pH value of the used sauce (Fig. 2–3). For example, for the canned foods “Meat in tomato sauce”, three storage periods can be distinguished:

- the first period (up to 6<sup>th</sup> month of storage) was characterized by a decrease in the peptide mass fraction by 14.2% due to destruction of raw material peptides and peptides formed in thermal treatment of the canned foods, with the growth in the residual nitrogen fraction at the equal quantity;
- the second period (from the 6<sup>th</sup> to 9<sup>th</sup> month of storage) was marked by the growth in the mass fraction of peptide nitrogen by 11.3% due to destruction of the protein constituent of the canned foods with a decrease in the residual nitrogen proportion at the equal quantity;
- the third period (from the 9<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup> month) was characterized by steady destruction of the peptide nitrogen fraction by 15.1% and a corresponding increase in the mass fraction of residual nitrogen.

In the canned foods “Meat in sour cream sauce”, two periods were noticed:

- the first period (up to 6<sup>th</sup> month of storage) was characterized by an increase in the mass fraction of peptide nitrogen by 14.9% due to destruction of the protein constituent of the canned foods with a decrease in the residual nitrogen proportion at the equal quantity;
- the second period (from the 6<sup>th</sup> to 9<sup>th</sup> month of storage) was marked by the growth in the mass fraction of peptide nitrogen by 10.5% due to its deep destruction with an increase in the residual nitrogen fraction at the equal quantity.

During storage of the sterilized canned foods, two principally different periods were noticed in the dynamics of the peptide and residual nitrogen fractions: the first period up to 6<sup>th</sup> month and the second period from the 6<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup> month. For the canned foods “Meat in tomato sauce”, the first period was characterized by a 19.1% increase in the mass fraction of peptide nitrogen due to the destruction processes in the protein constituent of the canned foods with a decrease in the residual nitrogen fraction at the

сервах «Мясо в сметанном соусе» было отмечено снижение на 8,7% доли фракции пептидного азота за счет его разрушения при повышении в равном количестве остаточной фракции азота. Таким образом, было отмечено отрицательное действие более кислого соуса на сохранность белковой фракции азота консервов.

Второй период — с 6 по 15 месяцев — характеризовался торможением деструктивных изменений фракции пептидного и остаточного азота как в пастеризованных, так и стерилизованных консервах. Степени изменения массовых долей фракций составили соответственно  $\pm 0,6\%$  и  $\pm 4,1\%$ .

Величина коэффициента детерминации служит главным критерием оценки качества линейных и нелинейных моделей. На рисунках 1–3 представлены уравнения регрессий для исследуемых величин с коэффициентом детерминации выше 80%, что позволяет признать полученные зависимости достаточно точными (коэффициент корреляции превышает 90%).

Образование amino-соединений и аммиачных оснований при термической обработке консервов связано с их образованием в результате дезаминирования и декарбоксилирования аминокислот, как свободных, так и частично находящихся в составе белков и полипептидов, а накопление сероводорода — в результате разрушения серосодержащих аминокислот. Очевидно, термообработанный продукт по качеству тем выше, чем меньше в нем аммиака, сероводорода, углекислоты. Но так как начальное их содержание в мясе может быть различным, их абсолютное содержание после пастеризации или стерилизации нельзя использовать для суждения о качественных изменениях продукта.

equal quantity. In the canned foods “Meat in sour cream sauce”, an 8.7% decrease in the mass fraction of peptide nitrogen was noticed due to its destruction with an increase in the residual nitrogen fraction at the equal quantity. Therefore, a negative effect of more acidic sauce on preservation of the protein nitrogen fraction was noticed in the canned foods.

The second period (from the 6<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup> month) was characterized by a retardation of the destructive changes in the peptide and residual nitrogen fractions both in the pasteurized and sterilized canned foods. A degree of changes in mass fractions were  $\pm 0.6\%$  and  $\pm 4.1\%$ , respectively.

A value of the determination coefficient is a main criterion for assessing quality of linear and non-linear models. Fig. 1–3 present the regression equations for studied values with the determination coefficient higher than 80%, which allows regarding the obtained dependencies as quite precise (a correlation coefficient exceeds 90%).

Formation of amino compounds and ammonia bases at thermal treatment of canned foods is associated with deamination and decarboxylation of amino acids — both free and partially existing in the composition of proteins and polypeptides, while accumulation of hydrogen sulphide is a result of breakdown of sulfur-containing amino acids. It is obvious that a thermally treated product has higher quality when the content of ammonia, hydrogen sulphide and carbon dioxide is lower. However, as their initial content in meat can be different, their absolute content after pasteurization or sterilization cannot be used for making a conclusion about qualitative changes in a product.

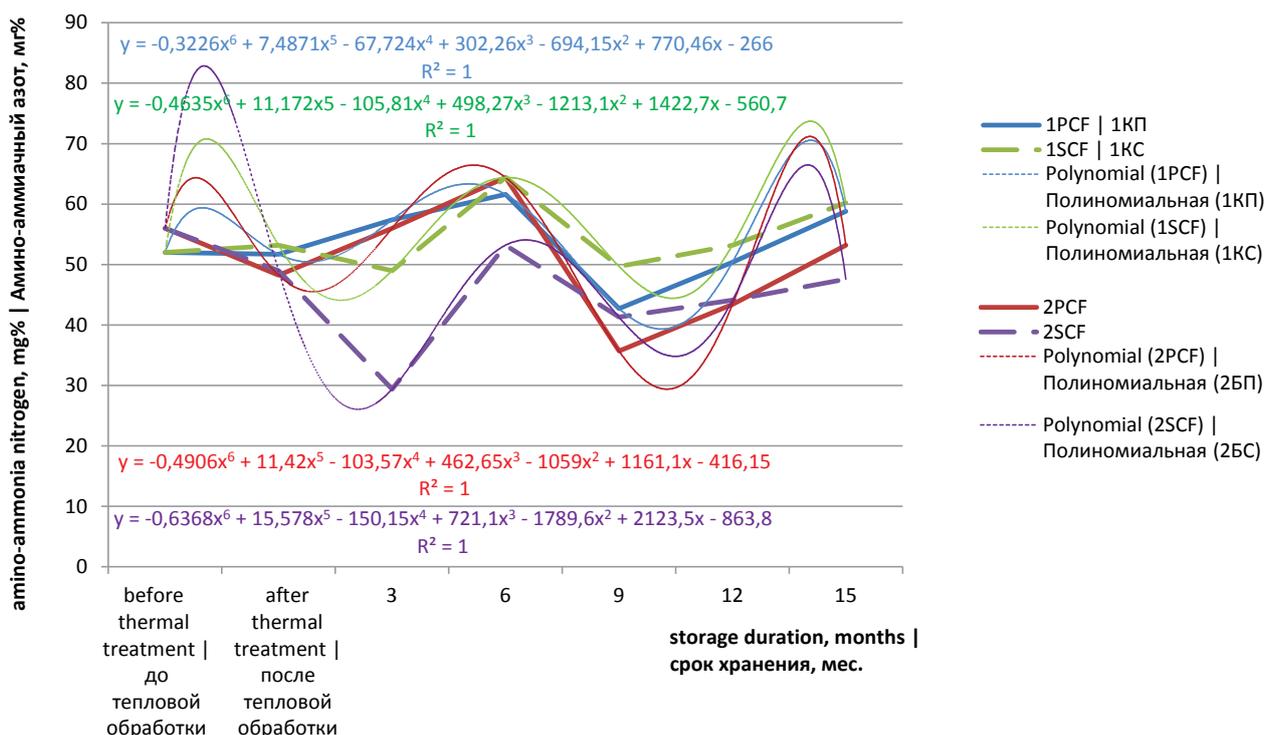


Figure 4. Dynamics of the amino-ammonia nitrogen content after production and during storage of canned foods

Рис. 4. Динамика содержания amino-аммиачного азота после производства и при хранении консервов

Более важным представляется динамика содержания amino-аммиачного азота при хранении консервов. Полученные результаты показали, что воздействие пастеризации или стерилизации на белковую составляющую консервов на примере содержания amino-аммиачного азота после производства мало различимо. В процессе хранения накопление ААА в среднем составило 12,4% вне зависимости от рН используемых соусов и тепловых нагрузок (рис. 4).

Равенство коэффициента детерминации единице, указанной на рисунке 4, означает, что динамика переменной в точности описывается полученными моделями.

### Выводы

В процессе проведения исследований деструктивных изменений белков консервов в соусе при разных видах тепловой обработки и последующего хранения установлено:

- воздействие температур пастеризации вызывает обратно пропорциональную зависимость динамики пептидной и остаточной фракций азота консервов независимо от рН системы;
- происходящие в пастеризованных консервах процессы изменений более динамичны, что связано, вероятно, и с наличием остаточной микрофлоры, обладающей протеолитическими свойствами, но не вызывающей глубокого гидролиза белков;
- воздействие температур стерилизации наносит более глубокие деструктивные изменения белка консервов не только при производстве, но в процессе хранения, динамика деструкции не имеет пограничных значений — процессы протекают плавно.

Из-за недостаточности исследований влияния пастеризации, ее продолжительности и интенсивности на динамику содержания общего и amino-аммиачного азота в консервах разных ассортиментных групп делать выводы о том, чем обусловлено разрушение азотистых соединений или образование низкомолекулярных соединений преждевременно. Следовательно, продолжение изучения вопроса в этом направлении актуально.

A dynamics of amino-ammonia nitrogen during canned food storage seems to be more important. The obtained results showed that an impact of pasteurization or sterilization on the protein constituent of the canned foods as seen in the example of amino-ammonia nitrogen after production is hardly distinguishable. During storage, an accumulation of amino-ammonia nitrogen was 12.4% irrespective of pH in the used sauces and thermal burdens (Fig. 4).

The determination coefficient equal to 1 as shown in Fig. 4 means that the dynamics of a variable is precisely described by the obtained models.

### Conclusions

During investigation of the destructive changes in proteins of the canned foods in sauce at different types of thermal treatment and subsequent storage, we established that:

- an action of pasteurization temperatures caused an inverse relationship of the dynamics of peptide and residual nitrogen fractions in the canned foods irrespective of the system pH;
- changes in the pasteurized canned foods were more dynamic, which was apparently associated with the presence of residual microflora that had the proteolytic properties but did not cause deep protein hydrolysis;
- an action of sterilization temperatures resulted in deeper destructive changes in protein of the canned foods not only in production but also during storage; the destruction dynamics did not have boundary values, the processes occurred steadily.

Due to insufficient investigations of a pasteurization impact, its duration and intensity on the dynamics of the content of total and amino-ammonia nitrogen in canned foods of different assortment groups, it is too early to make conclusions about the causes of destruction of nitrogenous compounds or formation of low molecular weight compounds. Therefore, the further investigation of this question is topical.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Памирский, И. Э. Влияние трипсина и ингибитора трипсина соевых бобов на свертывание крови, фибринолиз, агрегацию тромбоцитов и гемолитическую активность компонента *in vitro* / И.Э. Памирский, М.А. Штарберг, И.Г. Белоглазова, Е.А. Бородин. // Дальневосточный медицинский журнал. — 2008. — № 1. — С. 98–100.
2. Сметанина, Л.Б. Рациональные режимы стерилизации нового поколения консервированных паштетов из перепелиного мяса / Л.Б. Сметанина, А.Н. Захаров, Б.А. Лисицын // Все о мясе. — 2007. — № 2. — С. 20–23.
3. Орехович, В.Н. Денатурация белка / В.Н. Орехович, В.О. Шпикитер // Доклады академии наук СССР. — 1955. — Т. 101. — С. 529–533.
4. Белицер, В.А. Денатурационные превращения белков / В.А. Белицер. — М.: АН СССР. — 1955. — С. 320.
5. Jensen, E.V. Thermal coagulation of serum proteins. The effects of pH and of sulfhydryl reagents on the nature of the coagulum / E.V. Jensen, D.H. Verne, D.F. Tapley, C. Huggins // Journal of Biological Chemistry. — 1950. — Vol. 185. — P. 411–422.

## REFERENCES

1. Pamirsky, I. E. An effect of trypsin and the soybean trypsin inhibitor on blood coagulation, fibrinolysis, platelet aggregation and the complement hemolytic activity *in vitro* / I.E. Pamirsky, M.A. Shtarberg, I.G. Beloglazova, E.A. Borodin // Far-Eastern Medical Journal. — 2008. — № 1. — P. 98–100. ISSN
2. Smetanina, L.B. Rational regimes for sterilization of new generation of canned pates from quail meat / L.B. Smetanina, A.N. Zakharov, B.A. Lisitsyn // Vsy o myase. — 2007 — №.2 — P. 20–23.
3. Orekhovich, V.N. Protein denaturation / V.N. Orekhovich, V.O. Shpikiter // Reports of the Academy of Sciences of the USSR. — 1955. — Vol. 101. — P. 529–533.
4. Belitser, V.A. Denaturation changes in egg albumin / V.A. Belitser — M.: Academy of Sciences of the USSR. — 1955. — P. 320.
5. Jensen, E.V. Thermal coagulation of serum proteins. The effects of pH and of sulfhydryl reagents on the nature of the coagulum / E.V. Jensen, D.H. Verne, D.F. Tapley, C. Huggins // Journal of Biological Chemistry. — 1950. — Vol. 185. — P. 411–422.

6. Жоли, М. Физическая химия денатурации белков / М. Жоли. — М.: Мир, — 1968. — С. 364.
7. Hamm, R. Changes in hydration, solubility and changes of muscle proteins during heating of meat / R. Hamm, F.E. Deatherage // Food Research. — 1960. — Vol. 25. — № 5. — P. 587-610.
8. Грау, Р. Мясо и мясoproductы / Р. Грау. — М.: Пищевая промышленность, — 1964. — С. 190.
9. Кайм, Г. Технология переработки мяса: немецкая практика. — СПб.: Профессия, — 2006. — С. 488.
10. Хлебников В.И. Экспертиза мяса и мясных продуктов / В.И. Хлебников, И.А. Жебелева, В.И. Криштафович. — М.: Дашков и К, — 2008. — С. 132.
11. Крылова В.Б. Окислительно-восстановительный потенциал и динамика деструкции белка и жира при хранении мясных кусковых консервов.//Теория и практика переработки мяса. 2016;1(2):26-33. DOI:10.21323/2414-438X-2016-1-2-26-33
12. Крылова, В.Б. Трансформация белков, жиров и полисахаридов мясорастительных консервов/ В.Б. Крылова, Т.В. Густова, Г.П. Горошко, А.В. Эдер // Мясная индустрия.— 2008. — № 8. — С. 57-60.
13. A. Lisitsyn, V.B. Krylova, T.V. Gustova, and N.N. Mandzhiyeva Study of transformation processes of proteins in sterilized meat-plant products in polymer consumer package during their production and storage In the Proceedings of the 56th International Congress of Meat Science and Technology , August 15-20, 2010, Jeju, Korea, D024, P. 124.
14. Крылова В.Б., Вострикова Н.Л., Манджиева Н.Н. Влияние термообработки и сроков хранения на динамику аминокислотного состава вторых обеденных блюд // В сборнике: Инновационные технологии в производстве и переработке сельскохозяйственной продукции в условиях ВТО В 2-х частях. Материалы международной научно-практической конференции. Под редакцией В.Н. Храмовой. — 2013. — С. 13-16.
15. Эдер А.В. Разработка технологии мясных кусковых консервов из говядины в мягкой полимерной таре. Автореферат канд. диссертации. Москва, ВНИИМП. — 2010 — С. 28.
16. Соколов, А.А. Влияние температуры и продолжительности нагрева на гидролиз белков мяса и аминокислотный состав бульона / А.А. Соколов, М. Кемаль // Известия высших учебных заведений СССР. Пищевая технология. — 1962. — № 4. — С. 31-34.
17. Соколов А.А. Физико-химические и биохимические основы технологии мясoproductов / А.А. Соколов. — М.: ВНИИМП, — 1965. — С. 490.
18. Соколов А.А. Технология мяса и мясoproductов / А.А. Соколов, Д.В. Павлов, А.С. Болшаков и др. — М.: Пищевая промышленность, — 1970. — С. 740.
6. Zholi, M. Physical chemistry of protein denaturation / M. Zholi. — M.: Mir, 1968. — P. 364.
7. Hamm, R. Changes in hydration, solubility and changes of muscle proteins during heating of meat / R. Hamm, F.E. Deatherage // Food Research. — 1960. — Vol. 25. — № 5. — P. 587-610.
8. Grau, R. Meat and Meat Products/ R. Grau. — M.: Pischevaya Promishlennost, 1964. — P. 190.
9. Kaim G. Technology of meat processing: German practice. — St. Petersburg.: Profession, 2006. — 488 P.
10. Khlebnikov V.I. Expertise of meat and meat products / V.I. Khlebnikov, I.A. Zhebeleva, V.I. Krishtafovich. — M.: Dashkov and Co, 2008. — P. 132.
11. Krylova V.B. Redox potential and dynamics of protein and fat destruction during storage of canned meat in pieces // Theory and practice of meat processing. 2016;1(2):26-33. DOI:10.21323/2414-438X-2016-1-2-26-33
12. Krylova, V.B. Transformation of proteins, fats and polysaccharides in meat-and-plant canned foods/ V.B. Krylova, T.V. Gustova, G.P. Goroshko, A.V. Eder. // Meat Industry. — 2008. — № 8. — P. 57-60.
13. A. Lisitsyn, V.B. Krylova, T.V. Gustova, and N.N. Mandzhiyeva Study of transformation processes of proteins in sterilized meat-plant products in polymer consumer package during their production and storage In the Proceedings of the 56th International Congress of Meat Science and Technology , August 15-20, 2010, Jeju, Korea, D024, P. 124.
14. Krylova V.B., Vostrikova N.L., Mandzhiyeva N.N. An effect of thermal treatment and storage duration on the dynamics of amino acid composition of second course dinner dishes // In the composite book "Innovative technologies in production and processing of agricultural products in conditions of WTO. In 2 parts. Proceedings of the International scientific-practical conference. Under the editorship V.N. Khranova, — 2013. — P. 13-16.
15. Eder A.V. Development of the technology of canned beef in pieces in soft polymer packaging. Author's abstract of the dissertation for the degree of candidate of technical sciences. Moscow, VNIIMP. — 2010 — P. 28.
16. Sokolov A.A. An effect of temperature and heating duration on meat protein hydrolysis and a broth amino acid composition / A.A. Sokolov, M. Kemal // Bulletin of higher educational institutions of the USSR. Food technology. — 1962. — № 4. — P. 31-34.
17. Sokolov A.A. Physico-chemical and biochemical foundations of meat product technology / A.A. Sokolov. — M.: VNIIMP, — 1965. — P. 490.
18. Sokolov A.A. Technology of meat and meat products / A.A. Sokolov, D.V. Pavlov, A.S. Bolshakov et al. — M.: Pischevaya Promishlennost, — 1970. — P. 740.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

## Принадлежность к организации

**Крылова Валентина Борисовна** — доктор технических наук, профессор, главный научный сотрудник направления «Технология консервированных и экструдированных продуктов питания» отдела научно-прикладных и технологических разработок, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26  
Тел. 8-495-676-74-01  
E-mail: krylova-vniimp@yandex.ru

**Густова Татьяна Владимировна** — кандидат технических наук, доцент, ведущий научный сотрудник направления «Технология консервированных и экструдированных продуктов питания» отдела научно-прикладных и технологических разработок, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26  
Тел. 8-495- 676-78-11  
E-mail: krylova-vniimp@yandex.ru

## Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.01.2017

## AUTHOR INFORMATION

## Affiliation

**Krylova Valentina Borisovna** — doctor of technical sciences, professor, leading research scientist, the chief of the Direction "The technology of canned and extruded food products" of the Department of Scientific Applied and Technological Developments, The V.M. Gorbato All-Russian Meat Research Institute 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: 8-495-676-74-01  
E-mail: krylova-vniimp@yandex.ru

**Gustova Tatyana Vladimirovna** — candidate of technical sciences, docent, leading research scientist of the Direction "The technology of canned and extruded food products" of the Department of Scientific Applied and Technological Developments, The V.M. Gorbato All-Russian Meat Research Institute 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: 8-495-676-74-01  
E-mail: krylova-vniimp@yandex.ru

## Contribution

The authors have responsibility for the information in the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 20.01.2017

# ALTERNATIVE METHODS OF TECHNOLOGICAL PROCESSING TO REDUCE SALT IN MEAT PRODUCTS

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СОЛИ В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ

Tunieva E.K., Gorbunova N.A.

The V.M. Gorbatov All-Russian Meat Research Institute, Moscow, Russia

**Ключевые слова:** консервы, пастеризация, белок, деструкция.

**Keywords:** sodium chloride, crystal size, high pressure, salty taste.

### Аннотация

Мировые тенденции снижения поваренной соли в мясной продукции предполагают использование различных способов сохранения вкуса и консистенции готовой продукции, а также пролонгирование сроков годности. Существует несколько подходов к снижению хлорида натрия в мясной продукции. В статье представлен обзор зарубежных работ, свидетельствующих о возможности сохранения качества традиционных мясных продуктов с пониженным содержанием соли. Исследования в области восприятия соленого вкуса позволили установить, что уменьшения размера кристаллов соли до 20 мкм позволяет сократить количество вносимой поваренной соли за счет увеличения интенсивности соленого вкуса пищевых продуктов. В качестве еще одного подхода к снижению хлорида натрия в пищевых продуктах интерес представляет изучение совместимости различных направлений вкуса. Использование двухфазной эмульсии вода-в масле-в воде позволяет контролировать высвобождение инкапсулированных ингредиентов (соли), что позволяет усилить соленый вкус. Еще одним альтернативным способом технологической обработки мясного сырья для сокращения уровня поваренной соли в мясной продукции является применение высокого давления. Данный метод обладает целым рядом преимуществ, и позволяет не только увеличить интенсивность соленого вкуса, но и обеспечивает формирование стабильной эмульсии, повышает влагосвязывающую способность фарша и увеличивает сроки годности готового продукта.

### Abstract

The world trends in table salt reduction in meat products contemplate the use of different methods for preservation of taste and consistency in finished products as well as shelf life prolongation. There are several approaches to a sodium chloride reduction in meat products. The paper presents a review of the foreign studies that give evidence of the possibility to maintain quality of traditional meat products produced with the reduced salt content. The studies in the field of salty taste perception established that a decrease in a salt crystal size to 20  $\mu\text{m}$  enabled reducing an amount of added table salt due to an increase in the salty taste intensity in food products. Investigation of the compatibility of different taste directions is also interesting as one of the approaches to a sodium chloride reduction in food products. The use of water-in-oil-in-water (w/o/w) double emulsions allows controlling a release of encapsulated ingredients (salt), which enables enhancement of salty taste. The other alternative method of technological processing of meat raw material for reducing salt in meat products is the use of high pressure processing. This method has several advantages and allows not only an increase in the salty taste intensity, but also formation of a stable emulsion, an increase in water binding capacity of minced meat and extension of shelf-life.

### Введение

Многофункциональность поваренной соли, включая придание соленого вкуса, формирование консистенции и бактериостатическое действие делает ее незаменимым компонентом мясной продукции. Однако доказанная взаимосвязь между избыточным потреблением натрия, основным источником которого является поваренная соль, и развитием сердечно-сосудистых заболеваний, гипертонии и инсультов [1], ставит задачу снижения поваренной соли в пищевой продукции. Установлено, что снижение потребления населением натрия на 15% позволит сократить смертность от сердечно-сосудистых заболеваний у 8,5 млн человек через 10 лет [2].

В развитых странах (США, Бельгия, Япония и др.) эта проблема решается на государственном уровне. В России увеличение с каждым годом уровня потре-

### Introduction

Multiple functions of table salt, including the impartment of salty taste, formation of consistency and bacteriostatic action, make it an irreplaceable component of meat products. However, a proved relationship between an excessive consumption of sodium, the main source of which is table salt, and the development of the cardiovascular diseases, hypertension and stroke [1] sets a task of table salt reduction in food products. It was established that a 15% decrease in sodium consumption by population would enable reducing mortality caused by cardiovascular diseases in 8.5 million people over ten years [2].

In the developed countries (USA, Belgium, Japan and others), this problem has been solving at the state level. In Russia, an annual increase in the level of meat product

бления мясных продуктов влечет за собой повышение доли поваренной соли, поступающей в организм с пищей.

Так, технологическая переработка мяса, в котором изначально содержание натрия составляет 63–77 мг/на 100 г продукта, приводит к значительному повышению натрия в мясных продуктах: минимальное значение 311 мг/на 100 г и максимальное — 1030 мг/на 100 г соответственно.

Сокращение хлорида натрия в мясных продуктах является технически сложной задачей, поскольку требует сохранения желаемых функционально-технологических свойств: соленый вкус, увеличение растворимости мышечных белков и повышение влагосвязывающей способности, снижение роста микроорганизмов, которые в целом ряде случаев могут быть обеспечены применением других ингредиентов и технологических приемов, выполняющих аналогичные функции.

Наиболее простой подход к уменьшению содержания соли заключается в поэтапном постепенном снижении ее дозировки на 5–10 % до тех пор, пока органолептическая оценка не покажет ухудшения вкуса продукта.

Развитие альтернативных технологий снижения поваренной соли в мясных продуктах осуществляется различными способами, включающими уменьшение количества добавляемой поваренной соли; использование солезаменителей; замену части соли на бесхлоридные соли, например, фосфаты; использование ароматизаторов, усилителей вкуса; добавлением в рецептуру специй, пряностей, применением высокого гидростатического давления, комбинированием указанных методов.

#### *Снижение содержания соли в течение длительного периода времени*

Наиболее простым методом снижения количества соли является, так называемая, технология «снижения стелс» («reduction by stealth»), заключающаяся в постепенном снижении содержания соли в пищевых продуктах в течение длительного периода времени. При этом потребители ожидают получить продукты с меньшим содержанием соли, которые должны сохранять традиционный вкус и внешний вид и быть полезнее из-за сокращения содержания в нем натрия. Считается, что небольшое постепенное уменьшение содержания соли в течение длительного периода времени, позволяет потребителям, не ощущать изменений органолептических характеристик продуктов, а также способствует изменению чувствительности потребителя к солёности продукта. Минимальная продолжительность реализации этой технологии составляет не менее одного года.

Данный метод начал применяться в пищевых технологиях за рубежом с 1998 года. Так, снижение со-

consumption leads to a growth in a table salt proportion that enters the human body with food.

For example, technological processing of meat with the initial sodium content of 63–77 mg/100g of a product leads to a significant increase in sodium in meat products: the minimal level is 311 mg/100g and maximal level is 1030 mg/100g, respectively.

A sodium chloride reduction in meat products is a technically difficult task as it is necessary to maintain desired functional and technological characteristics: salty taste, an increase in muscle protein solubility and an increase in water binding capacity, a decrease in a microbial growth, which in many cases can be provided by using other ingredients and technological means with similar functions.

The simplest approach to reducing the salt content is a stage-wise gradual decrease in its doses by 5–10 % until the point when an organoleptic assessment will show product taste deterioration.

The development of alternative technologies of a table salt reduction in meat products is carried out by different methods, including a decrease in the quantity of added table salt; the use of salt replacers, partial salt replacement with chloride-free salts, for example, phosphates; use of flavoring agents; addition of spices into a recipe, use of high hydrostatic pressure and combination of the indicated methods.

#### *Reduction of salt over a long period of time*

The simplest method of salt reduction is, the so-called, technology of reduction by stealth that consists in a gradual reduction of the salt content in food products over a long period of time. With that, consumers expect obtaining products with less salt content which would retain the traditional taste and appearance and be healthier due to a sodium content reduction. It is considered that a low gradual reduction in the salt content over a long period of time will allow consumers not to sense changes in product organoleptic characteristics and facilitate changes in consumers' sensitivity to product saltiness. The minimal duration of this technology realization is not less than a year.

This method has begun to be used in food technologies abroad since 1998. For example, a reduction of the salt

держание соли, используя метод «стелс», в продуктах фирмы Heinz позволило уменьшить содержание соли на: 40 % в консервированной фасоли, 38 % — в майонезе, 29 % — в томатном кетчупе [3]. Для мясных продуктов данный метод еще не использовался.

#### *Промышленные композиции солезаменителей*

Наиболее широко в научной литературе освещены результаты исследований, направленных на изучение влияния частичной замены поваренной соли на хлориды калия, кальция, реже хлорид магния, аммония в технологии мясных продуктов и оценку их действия на функционально-технологические и качественные показатели и безопасность мясной продукции, изготовленной с их использованием [4], а также возможности применения других солезаменителей, например, композиции из лизина и янтарной кислоты, имеющей солоноватый вкус и определенные противомикробные и антиоксидантные свойства, и которая может быть использована как заменитель до 75 % поваренной соли.

Данные многолетних исследований в области разработки композиций, позволяющих сократить дозировку хлорида натрия в пищевых продуктах, уже дали свои результаты в виде коммерческих препаратов солезаменителей. Так, компанией «AkzoNobel» разработана композиция на основе хлорида калия, с добавлением вкусоароматических экстрактов и ароматизаторов для смягчения горького привкуса. Стоит отметить, что предложенная технология получения солезаменителей представляет собой не механическое смешивание отдельных ингредиентов, а производство гранул с равномерным распределением всех составных компонентов, что препятствует расслаиванию смеси в процессе транспортирования и хранения. В качестве таких препаратов фирмой «AkzoNobel» представлены солезаменители марки Suprasel, представляющие собой смесь хлорида натрия, хлорида калия и вкусоароматических ингредиентов. При использовании Suprasel взамен поваренной соли в равном количестве, содержание хлорида натрия в продукте снижается на 35–40 %.

Известны коммерческие препараты соли с пониженным содержанием натрия — Diasal, Co-Salt, Adolph's Salt Substitute, Morton Salt Substitute и др.

#### *Восприятие соленого вкуса и усилители вкуса*

Важной задачей при сокращении содержания хлорида натрия в мясных продуктах является сохранение их традиционного соленого вкуса.

Известно, что использование компонентов с разными вкусовыми направлениями позволяет усиливать или подавлять интенсивность вкуса [5]. Например, кислый и соленый вкус симметрично влияют на интенсивность друг друга, усиливая при низких концентрациях и подавляя при высоких интенсивностях/концентрациях [6]. Горечь подавляется в присутствии

content using the stealth method in the products of Heinz company allowed reducing the salt content in canned kidney beans by 40 %, in mayonnaise by 38 %, 29 % in tomato ketchup by 29 % [3]. This method has not yet been used for meat products.

#### *Commercial compositions of salt substitutes*

In the scientific literature, the results of the research aimed at studying an effect of partial table salt replacement with potassium and calcium chlorides in the meat product technology and an assessment of their effect on the functional and technological properties, qualitative indicators and safety of meat products manufactured with their use are the most broadly covered [4]. Less often, the studies are concerned with the use of magnesium and ammonium chlorides as well as the use of other salt substitutes; for example, a composition of lysine and succinic acid, which has a salty taste and certain antimicrobial and antioxidant properties and can be used as a replacer of up to 75 % of table salt.

The data of long-term research in the field of developing compositions that allow reducing a sodium chloride dose in food products have already given their results in the form of commercial preparations of salt substitutes. For example, AkzoNobel has developed a composition based on potassium chloride with addition of flavoring extracts and flavoring agents to mask the bitter aftertaste. It is necessary to note that the proposed technology for salt substitute production is not mechanical mixing of separate components, but production of grains with the homogeneous distribution of all constituents, which prevents de-mixing in the process of transportation and storage. AkzoNobel presents the salt replacer Suprasel, which is a mixture of sodium chloride, potassium chloride and flavor-enhancing ingredients. When using Suprasel instead of table salt in an equal amount, the sodium chloride in a product is reduced by 35–40 %.

The commercial preparations of Diasal, Co-Salt, Adolph's Salt Substitute, Morton Salt Substitute and others are available.

#### *Perception of salty taste and flavor enhancers*

An important task in a sodium chloride reduction in meat products is maintaining their traditional salty taste.

It is known that the use of components with different taste directions allows enhancing or suppressing the taste intensity [5]. For example, sour or salty taste symmetrically influences the intensity of each other enhancing at low concentrations and suppressing at high intensities/concentrations [6]. Bitterness is suppressed in the presence of so-

натрия при любой концентрации, в то время как соленый вкус менее подвержен горечи. Сладость подавляет соленый вкус [7]. При этом вкусовые ощущения воспринимаются с различной скоростью, и наиболее быстро возникает ощущение соленого вкуса.

Известно, что хлорид натрия диссоциирует на ионы натрия и хлора, которые придают соленый вкус. В настоящее время установлено, что, в первую очередь, за соленый вкус отвечает ион натрия, в то время как ион хлора играет модулирующую роль [8]. Восприятие соленого вкуса начинается, когда натрий, присутствующий в продукте активирует эпителиальные натриевые каналы (epithelial sodium channels) (ENaCs) на вкусовых рецепторах и афферентный сигнал отправляется в область мозга, отвечающую за восприятие вкуса. Определение солености происходит, когда концентрация натрия достаточно высока не только для того чтобы активировать вкусовые рецепторы, но также для производства электрических импульсов, которые могут быть проведены через сенсорные нейроны в мозг, где они декодируются, позволяя оценить вкусовые характеристики. Это известно как порог распознавания [2].

Использование некоторых усилителей вкуса, таких как глутамат натрия, инозинат натрия, экстракт дрожжей, гидролизованный растительный белок позволяет усилить соленый вкус и сократить содержание натрия в готовом продукте [9]. McGough и соавт. объясняют эффект «солености», придаваемый усилителями вкуса за счет активации рецепторами вкуса умами [10]. Однако, молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе восприятия вкуса соли не полностью изучены, что усложняет поиск оптимальных компонентов, позволяющих усилить соленый вкус.

#### *Оптимизация размеров и формы соли, как способ снижения ее содержания*

Восприятие соленого вкуса также связано с формой и размерами кристаллов соли [4–6, 9].

По данным Rama и соавт., размер кристаллов соли имеет основополагающее значение, так как чем меньше кристаллы соли, тем легче она проникает в продукт, что приводит к увеличению восприятия соленого вкуса. Считается, что восприятие соленого вкуса происходит из-за растворимости хлорида натрия в полости рта, что приводит к увеличению восприятия ее вкуса [6]. Исследования Kilcast и соавт. подтверждают, что чем меньше размер частиц, тем быстрее скорость растворения и, следовательно, выше уровень и интенсивность восприятия соли [9].

Сохранение интенсивности соленого вкуса возможно при использовании инкапсулированной соли, что позволяет уменьшить ее содержание в продукте до 50 % [11], однако при использовании инкапсулированной соли также целесообразно использовать более мелкие кристаллы.

dium in any concentration, while salty taste is less affected by bitterness. Sweetness suppresses salty taste [7]. With that, taste sensations are perceived with different rate and sensations of salty taste appear most rapidly.

It is known that sodium chloride is dissociated on the sodium and chloride ions, which imparts the salty taste [5]. At present, it is established that the sodium ion is mainly responsible for salty taste, while the chloride ion plays a modulating role [8]. Perception of salty taste begins when sodium present in a product activates the epithelial sodium channels (ENaCs) on taste receptors and the afferent signal is sent to the brain area that is responsible for taste perception. Detection of saltiness takes place when the sodium concentration is high enough not only for activation of taste receptors but also for generation of electric impulses that can be transmitted through the sensory neurons to the brain, where they are decoded enabling evaluation of taste characteristics. This is known as the detection threshold [2].

The use of several flavor enhancers such as sodium glutamate, sodium inosinate, yeast extracts, hydrolyzed plant protein allows enhancing salty taste and reducing the sodium content in a finished product [9]. McGough et al. explain that an effect of saltiness imparted by flavor enhancers is conditioned by the activation of umami flavor by receptors [10]. However, the molecular and cellular mechanisms underlying the perception of salty taste are not fully studied which makes it more difficult to find optimal components that can enhance salty taste.

#### *Optimization of a salt size and shape as a method for reducing its content*

Salty taste perception is also associated with the salt crystal size and shape [4–6, 9].

According to the data of Rama et al., the salt crystal size is of utmost importance as the smaller salt crystals, the easier it penetrates the product, which leads to an increase in salty taste perception. It is considered that salty taste perception takes place due to sodium chloride solubility in the oral cavity, which leads to an increase in perception of its taste [6]. Kilcast et al. confirm that the less the particle size, the higher the rate of its dissolution and, consequently, the higher the level and intensity of salt perception [9].

Is it possible to maintain the salty taste intensity when using encapsulated salt, which allows reducing its amount in a product up to 50 % [11]; however, when using encapsulated salt it is also expedient to use smaller crystals.

В последние годы такие компании, как «Мортон» и «Каргилл» оптимизировали физическую форму кристаллов поваренной соли для того, чтобы сделать их более растворимыми [4]. J. Johnson и соавт. запатентовали композицию, обеспечивающую снижение соли, состоящую из частиц морской соли размером до 20 мкм и ароматизаторов [12]. По мнению Liem и соавт. использование данного способа позволит снижать содержание соли в мясной продукции без уменьшения соленого вкуса [2].

Исследования показали, что использование чешуйчатой соли (flake salt) (соль в виде тонких хлопьев) может быть способом снижения содержания соли в мясных продуктах [4]. Ее применение более функционально, она быстрее растворяется и обеспечивает увеличение pH, повышение растворимости белков и выхода готовой продукции. Наиболее целесообразно ее использование при производстве мясной продукции, в рецептуру которой не входит вода, например, — для сыровяленной.

Компания MortonSalt описывает свою разработку — дендритную соль StarFlake как «гибрид», в котором скомбинированы наиболее полезные свойства кристаллической и чешуйчатой соли. Разветвленные или «звездчатые» кристаллы такой соли обладают низкой плотностью, высокой удельной поверхностью, высокой скоростью растворения и, что особенно подчеркивается, макропористостью. Такая форма соли, по утверждению компании может быть использования для снижения уровня NaCl в мясных продуктах [4].

***Обработка с использованием  
высокого гидростатического давления  
и оценка возможности использования  
нетрадиционных методов при посоле***

Еще одним методом снижения содержания соли в мясных продуктах является применение альтернативных методов технологической обработки мясного сырья. Рядом зарубежных исследователей доказана перспективность использования технологии обработки мясного сырья высоким гидростатическим давлением для снижения хлорида натрия в готовом продукте. Обработки под высоким давлением — это тепловой метод сохранения продукции, который инактивирует вегетативные формы патогенных микроорганизмов с помощью давления, а не температуры. Для этого используют давление около 400–600 МПа и умеренные температуры процесса (<45 °C), что позволяет обеспечить минимальное воздействие на вкус, консистенцию, внешний вид и пищевую ценность [13, 14]. Данный эффект достигается в результате изменения функциональных свойств белков, таких как поглощение и удержание воды, улучшение эмульгирующей способности и растворимости миофибриллярных белков [15]. Предполагается, что воздействие высоким

In recent years, such companies as Morton and Cargill have optimized the physical shape of table salt crystals to make them more soluble [4]. J. Johnson et al. patented a composition that ensures a table salt reduction and consists in the particles of sea salt with a size of up to 20 µm and flavoring agents [12]. According to Liem et al., the use of this method will allow lowering the salt content in meat products without reducing salty taste [2].

The studies showed that the use of flake salt (salt in the form of thin flakes) can be a method for lowering the salt content in meat products [4]. Its use is more functional, it is dissolved faster and provides an increase in pH, protein solubility and finished product yield. It is most expedient to use it in production of meat products, which recipes do not contain water, for example, for air dried products.

Morton Salt Company describes its product, dendritic salt Star Flake, as a hybrid, which combines the most beneficial properties of crystal and flake salt. The branched or «star» crystals of this salt have low density, high specific surface, high rate of dissolution and, which is especially emphasized, macro-porosity. According to the statement of the company, this form of salt can be used for reducing the NaCl level in meat products [4].

***Processing using high hydrostatic  
pressure and assessment of the possibility  
to use non-traditional methods in curing***

The other method for reducing salt in meat products is the use of alternative methods for technological processing of meat raw material. Several foreign researchers proved the potential of using the technology of meat raw material processing with high hydrostatic pressure to reduce sodium chloride in a finished product. High pressure processing is a thermal method of product preservation, which inactivates the vegetative forms of pathogenic microorganisms by pressure and not by temperature. To this end, a pressure of 400–600 MPa and moderate process temperatures (<45 °C) are used, which ensures a minimal impact on taste, consistency, appearance and nutritive value [13, 14]. This effect is achieved as a result of changes in the protein functional properties, such as water absorption and retention, an improvement in emulsifying capacity and myofibrillar protein solubility [15]. It is suggested that an exposure to high pressure has an effect similar to that

давлением оказывает действие подобное действию соли на солубилизацию миофибриллярных белков путем изменения пространственной структуры белков и способствует образованию гелей миофибриллярных белков при низкой концентрации соли (1,2%), что перспективно для снижения соли в мясных продуктах [16]. Кроме того, в некоторых исследованиях отмечено, что обработка высоким давлением усиливает восприятие солености мясных продуктов [17]. Обработка высоким давлением обладает отличным потенциалом в качестве дополнительной технологии, чтобы увеличить срок годности мясной продукции с пониженным содержанием соли. O'Flynn и соавт. сравнили эффект воздействия высоко давления до 150 МПа на колбасы из свинины с разным содержанием соли (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, и 2,5%). Снижение содержания поваренной соли менее 1,5% оказывало негативное влияние на цвет и консистенцию продукта. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют, что обработка при 150 МПа имеет перспективы для производства сосисок, при условии концентрации соли не менее 2% [18].

Развитие направления использования высокого давления для изготовления мясной продукции с пониженным содержанием хлорида натрия предполагает изучение многофакторного процесса, учитывающего несколько параметров: давление, температура продолжительность, а также дозировка соли и других ингредиентов, влияющих на функциональные свойства мясных продуктов [19, 20]. Исследования, проведенные Villamonte и соавт. установили положительное влияние высокого давления на влагосвязывающую способность, что предполагает возможность снижения не только содержания поваренной соли, но и пищевых фосфатов. Так, Declan J. Troy и соавт. оценивали эффективность использования высокого давления для снижения уровня соли и фосфатов в сосисках для завтрака. Исследователями установлено, что обработка сырого мясного фарша давлением 50, 150 и 300 МПа позволила уменьшить содержание соли в сосисках с 2,5% до 1,5% и фосфатов с 0,5% до 0,25% без ухудшения качества продукта и его микробиологической безопасности, с одновременным снижением потерь при термообработке и увеличением выхода. Обработка под давлением 150 МПа обеспечила максимальную стабильность фаршевой эмульсии, наилучшие показатели влагосвязывающей способности, сочности, консистенции и др. без ухудшения цветовых и вкусовых характеристик, что связано с улучшением функциональных свойств мышечных белков в результате повышения растворимости определённых миофибриллярных белков и улучшения связывания между частицами мяса в мясных продуктах эмульсионного типа [20].

Clariana и соавт. исследовали влияние высокого давления на сыровяленые продукты из мяса и установили, что выраженность соленого вкуса увеличи-

of salt on of myofibrillar protein solubilization by changing the protein spatial structure and favors myofibrillar protein gelation at the low salt concentration (1.2%), which is promising for reducing salt in meat products [16]. In addition, several studies found that high pressure processing enhances the perception of saltiness in meat products [17]. High pressure processing has an excellent potential as an additional technology to extend shelf-life of products with the reduced salt content. O'Flynn et al. compared an effect of pressure (up to 150 MPa) on pork sausages with different salt content (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5%). A reduction in the table salt content less than 1.5% had a negative impact on product color and consistency. Nevertheless, the obtained results suggest that processing at 150 MPa is promising for frankfurter production provided that the salt concentrations is not less than 2% [18].

The development of the direction of using high pressure for manufacturing meat products with reduced salt content involves the study of a multifactorial process that takes into consideration several parameters: pressure, temperature, duration and doses of salt and other ingredients influencing functional properties of meat products [19, 20].

Villamonte et al. established a positive effect of high pressure on water binding capacity, which suggests a possibility to reduce not only the table salt content but also food-grade phosphates. Declan J. Troy et al. assessed the effectiveness of using high pressure for reducing the salt and phosphate levels in frankfurters. The researchers established that high pressure (50, 150 and 300 MPa) processing of raw minced meat made it possible to reduce the salt and phosphate content in frankfurters from 2.5% to 1.5% and from 0.5% to 0.25%, respectively, without impairing product quality and microbiological safety with a simultaneous decrease in cook losses and yield increase. Processing with 150 MPa pressure ensured maximal emulsion stability, the best values of the water binding capacity, juiciness, consistency and so on without deteriorating color and flavor characteristics, which was associated with an improvement in functional properties of muscle proteins as a result of an increase in solubility of certain myofibrillar proteins, as well as an improvement in binding between meat particles in emulsified meat products [20].

Clariana et al. studied an effect of high pressure on dry-cured meat products and established that the intensity of salty taste increased as a result of high pressure

валась в результате применения высокого давления (более 500 МПа). На основании этого, было высказано предположение, что высокое давление изменяет взаимодействие между ионами натрия и белками, высвобождая ионы натрия и повышая их доступность для вкусовых рецепторов. В соответствии с проведенными исследованиями высокое давление способно обеспечить естественное увеличение «солености», тем самым являясь альтернативой для снижения содержания соли [17].

В немецком институте пищевых технологий (DIL) изучалась возможность снижения поваренной соли в вареной ветчине при использовании высокого давления. При проведении исследований производили ветчину по традиционной технологии с содержанием соли 0; 0,95; 1,33 и 1,90 %. Воздействие на продукт давлением 100, 300 и 600 МПа осуществляли на отдельных этапах обработки в течение 5 мин (сырье, после инъектирования, после массажирования и после термообработки). Исследователями установлено, что наиболее целесообразно для снижения содержания соли до 30 % применять высокое давление 100 МПа после массажирования, влагосвязывающая способность при этом увеличивается на 5 % и снижаются потери при варке [21, 22].

Однако при всех положительных моментах использования высокого давления последствия его применения на безопасность пищевых продуктов еще остаются не исследованными, поэтому нельзя исключить возможный токсичный эффект от его использования в пищевой промышленности. Известно, что высокое давление способно изменять активность ферментов и структуру некоторых белков, за счет разрушения водородных и гидрофобных связей [23–25].

За рубежом в качестве альтернативной технологии в процессе посола для снижения нитрита натрия изучались возможности использования воды после плазменной обработки. Oehmigen и соавт. [26] сообщали, что взаимодействие плазмы с жидкостью приводит к формированию активных форм азота, таких как нитрат ( $\text{NO}_3^-$ ) и нитрит ( $\text{NO}_2^-$ ), а также активных форм кислорода, которые приводят к уничтожению микроорганизмов. Таким образом, было сделано предположение, что нитрит, образующийся в воде после ее обработки плазмой, может быть использован в процессе посола мясных продуктов.

Корейские ученые [27] подтвердили, что после плазменной обработки (PTW) дистиллированной воды в течение 60 минут она содержала 50 миллионных долей нитрита. Чтобы оценить влияние PTW на формирование цвета мяса были изготовлены различные образцы мясного фарша в зависимости от рецептуры (контроль — мясной фарш без добавления источника нитрита; мясной фарш с добавлением PTW; мясной фарш с добавлением нитрита натрия). После термической обработки мясного фарша между экспе-

application (more than 500 MPa). Based on these results, it was suggested that high pressure changed the interaction between the sodium ions and proteins, releasing the sodium ions and increasing their accessibility to the taste receptors. According to the performed research, high pressure can provide a natural increase in saltiness, being, therefore, an alternative method for salt reduction [17].

In the German Institute of Food Technologies (DIL), the possibility of a table salt reduction in cooked ham when using high pressure was studied. In the study, ham was produced according to the traditional technology with the salt content of 0; 0.95; 1.33 and 1.90 %. A product was exposed to high pressure (100, 300 and 600 MPa) for 5 min. at different stages of processing (raw material, after injection, after tumbling and after cooking). The researchers established that for salt reduction to 30 %, it is most expedient to use high pressure (100 MPa) after tumbling; the water binding capacity in this case increased by 5 % and cook losses decreased [21, 22].

However, with all positive aspects of the high pressure use, the consequences of its application in terms of food safety are still not fully established; thus, the toxic effect of its use in the food industry cannot be excluded. It is known that high pressure can change enzyme activities and a structure of several proteins due to disruption of the hydrogen and hydrophobic bonds [23–25].

The possibilities to use water after plasma treatment were studied abroad as an alternative technology in the curing process for a sodium nitrite reduction. Oehmigen et al. [26] reported that interaction of plasma with liquids resulted in formation of the reactive nitrogen species such as nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), as well as the reactive oxygen species, which led to the antimicrobial effects. Therefore, it was suggested that nitrite formed in water after plasma treatment can be used in the process of meat product curing.

The Korean researchers [27] confirmed that after plasma treatment of distilled water for 60 min., it contained 50 ppm of nitrite. To assess the effect of plasma-treated water (PTW) on meat color formation, different minced meat samples were produced depending on formulations (control — minced meat without a nitrite source; minced meat with addition of PTW and minced meat with addition of sodium nitrite). After thermal treatment of minced meat,

риментальными группами не было отмечено никакого существенного различия в значениях цветовых характеристик светлоты  $L^*$  и желтизны  $b^*$ . Значения красноты  $a^*$  термически обработанного мясного фарша с РТW были существенно выше по сравнению с контрольной группой. Однако значения  $a^*$  термически обработанного фарша с РТW были ниже, чем у фарша с нитритом натрия. Таким образом, можно заключить, что РТW может использоваться в качестве источника нитрита в процессе посола мясных продуктов.

### *Применение двухфазных эмульсий*

Одним из методов, позволяющих снизить содержание соли в мясных продуктах, является использование двухфазной эмульсии вода-в масле-в воде (W/O/W). Одним из полезных свойств двойных эмульсий является то, что их применение позволяет контролировать высвобождение инкапсулированных ингредиентов (соли), позволяющих усилить вкус вещества при попадании в полость рта. Главный недостаток таких эмульсий — термодинамическая неустойчивость и короткий срок годности. Установлено, что более интенсивное восприятие соли в меньшей концентрации введения в продукт выше в присутствии соли во внутренней водной фазе [28].

Кроме того, Frasch-Melnik и соавт. [28] установили возможность замены соли во внутренней водной фазе хлористым калием, т.к. жировая фаза вокруг внутренней водной фазы позволяет маскировать горький вкус хлорида калия, в то время как хлорид натрия может присутствовать только в наружной водной фазе, что повышает восприятие соленого вкуса продукта. Этот подход имеет большие перспективы, учитывая то, что жировая фаза может нивелировать посторонний привкус, то содержание хлорида калия может быть увеличено, а, значит, содержание поваренной соли может быть сокращено. Однако, при этом следует учитывать, что увеличение содержания калия может спровоцировать проблемы со здоровьем, особенно у лиц с заболеваниями почек.

### **Заключение**

Таким образом, существует несколько способов технологической обработки без использования заменителей хлорида натрия, применение которых в производстве мясной продукции позволит сократить внесение поваренной соли без ухудшения традиционного вкуса и срока годности:

- сокращение размеров кристаллов вносимой поваренной соли до 20 мкм;
- внесение компонентов, усиливающих соленый вкус мясной продукции;
- использование двухфазной эмульсии вода-в масле-в воде;
- обработка мясного сырья высоким давлением.

Однако проблемы в развитии этого направления в промышленных масштабах свидетельствуют о необ-

no significant differences were found between the experimental groups in the lightness ( $L^*$ ) and redness ( $b^*$ ) values. The  $a^*$  values in thermally treated minced meat with РТW were significantly higher compared to that in the control group. However, the  $a^*$  values in thermally treated minced meat with РТW were lower than that in thermally treated minced meat with sodium nitrite. Thus, it can be concluded that РТW can be used as a nitrite source in meat product curing.

### *Use of double emulsions*

One of the methods that enable reducing salt content in meat products is the use of water-in-oil-in-water (w/o/w) double emulsions. One of the beneficial properties of double emulsions is the fact that their use makes it possible to control a release of encapsulated ingredients (salt), which allows enhancing taste of a substance upon its entering the oral cavity. The main disadvantage of such emulsions is their thermodynamic instability and short shelf-life. It was established that upon salt addition into a product in lower concentration, its perception was more intense when salt was present in the internal water phase [28].

Moreover, Frasch-Melnik et al. [28] established the possibility to replace salt in the internal water phase with potassium chloride as the fat phase around the internal water phase enables masking bitter taste of potassium chloride; at the same time, sodium chloride can be present only in the external water phase, which increases a salty taste perception in a product. This approach is very promising. Taking into consideration that the fat phase can neutralize off-flavor, the potassium chloride content can be increased and, consequently, the sodium chloride content can be reduced. However, it is necessary to keep in mind that an increase in the potassium content can cause health problems especially in individuals with kidney diseases.

### **Conclusion**

Therefore, there are several methods of technological processing without using sodium chloride substitutes, which application in meat product manufacture will enable reducing table salt addition without deteriorating the traditional taste and shelf life:

- lowering a crystal size of the added table salt to 20  $\mu\text{m}$ ;
- adding components that enhance salty taste in meat products;
- using water-in-oil-in-water (w/o/w) double emulsions;
- high pressure processing of meat raw material.

However, the problems in the development of this direction at industrial scale indicate a necessity of further

ходимости дальнейших исследований для оптимизации органолептических и технологических свойств готовой продукции. Многие страны мира разработали свои собственные программы снижения потребления соли. Совместная работа научно-исследовательских учреждений и предприятий пищевой промышленности способна принести положительные результаты в направлении снижения поваренной соли в мясной продукции.

investigations to optimize the organoleptic and technological properties of finished products. Many countries in the world have developed their own programs to reduce salt consumption. Cooperative work of research institutes and food industry enterprises can give positive results in the field of table salt reduction in meat products.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- MacGregor, G.A. Salt — overwhelming evidence but still no action: Can a consensus be reached with the food industry? / G.A. MacGregor, P.S. Sever // *BMJ*. — 1996. — Vol. 312. — P. 1287–1289.
- Liem, D.G. Reducing Sodium in Foods: The Effect on Flavor/ D.G. Liem, F.Miremedi, R. S. J. Keast // *Nutrients*. — 2011. — Vol. 3. — P. 694–711
- Wallis, K., Chapman S. Food and health innovation service. Current innovations in reducing salt in food products/Gloucestershire: Campden BRI. — [Electronic resource]. — 2012. Retrieved from <http://www.foodhealthinnovation.com>. (access date 29.12.2016)
- Desmond E. Reducing salt: A challenge for the meat industry/ E. Desmond // *Meat Science*. — 2006. — Vol. 74. — P. 188–196.
- Breslin, P.A. Suppression of bitterness by sodium: Variation among bitter taste stimuli / P.A. Breslin, G.K. Beauchamp // *Chem. Senses*. — 1995. — Vol. 20. — P. 609–623.
- Keast, R.S.J. Modifying the bitterness of selected oral pharmaceuticals with cation and anion series of salts/ R.S.J., Keast, P. A.S. Breslin // *Pharm. Res.* — 2002. — Vol. 19. — P. 1019–1026.
- Keast, R.S.J. An overview of binary taste-taste interactions/ R.S.J. Keast, P. A.S. Breslin // *Food Qual. Pref.* — 2003. — Vol. 14. — P. 111–124.
- Bartoshuk, L. M. Sensory analysis of the taste of NaCl// *In Biological and behavioral aspects of salt intake*, edited by M.R. Kare, M. J. Fregly, and R. A. Bernard. — 1980. — New York: Academic Press. — P. 83–98.
- Wallis, K., Chapman S. Food and health innovation service. Current innovations in reducing salt in food products/Gloucestershire: Campden BRI. — [Electronic resource]. — 2012. Retrieved from <http://www.foodhealthinnovation.com>. (access date 29.12.2016)
- McGough M. M. Reducing sodium levels in frankfurters using a natural flavor enhancer/ M.M. McGough, T. Sato, S. A. Rankin, J. J. Sindelar // *Meat Science*. — 2012. — Vol. 91(2). — P. 185–194.
- Rodrigues, F.M. Alternatives to reduce sodium in processed foods and the potential of high pressure technology/ F.M. Rodrigues, A. Rosenthal, J. H. Tiburski, A. Gomes da Cruz // *Food Sci. Technol (Campinas)*. — 2016. Vol. 3. — P. 1–8.
- Johnson, C., Jensen, L. Schilmoeller, Smith, G. Seasoning and method for seasoning a food product utilizing small particle sea salt/United States Patent US № 7923047 (B2). — 12th April 2011.
- Cruz, A.G. High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing / A.G. Cruz, A.F.J. Faria, S.M.I. Saad, H.M.A Bolini, A.S. Sant'Ana, M. Cristianini // *Trends in Food Science and Technology*. — 2010. — Vol. 21(10). — P. 483–493.
- Vercammen, A. Shelf-life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives/ A. Vercammen, K. G. A.Vanoirbeek, I. Lurquin, L. Steen, O.Goemaere, S. Szczepaniak, H. Paelinck, M. E. G.Hendrickx, C. W. Michiels // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. — 2011. — Vol. 12(4). — P. 407–415.
- Iwasaki, T. Studies of the effect of hydrostatic pressure pretreatment on thermal gelation of chicken myofibrils and pork meat patty/ T. Iwasaki, K. Noshiroya, N. Saitoh, K.Okano, K. Yamamoto // *Food Chemistry*. — 2006. — Vol. 95(3). — P. 474–483.
- Cheftel, J.C. Effects of High Pressure on Meat: A Review/ J.C.Cheftel, J.Culioli // *Meat Science*. — 1997. — Vol. 46. — P. 211–236.
- Clariana, M. Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed drycured ham. Effects along the storage period/ M. Clariana, L. Guerrero, C. Sárraga, I. Díaz, A. Valero, J.A. García-Regueiro, // *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. — 2011. — Vol. 12. — P. 456–465.
- O'Flynn, C. C. The application of high-pressure treatment in the reduction of salt levels in reduced-phosphate breakfast sausages / C. C. O'Flynn, M. C. Cruz-Romero, D. Troy, A. M. Mullen, J. P. Kerry // *Meat Science*. — 2014. — Vol. , 96(3). — P. 1266–1274.
- Villamonte, G. Functionality of pork meat proteins: impact of sodium chloride and phosphates under high-pressure processing / G. Villamonte, H. Simonin, F. Duranton, R. Chéret, de M. Lamballerie // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. — 2013. — Vol. 18. — P. 15–23.
- Troy, D. J. High pressure technology in the manufacture of minimally-processed meat products/ D. J. Troy, C.C. Chem, C. Crehan, A.M. Mullen, E. Desmond // *The National Food Centre, Dunsinea, Castleknock, Dublin 15*. — 2001. — P. 19.
- Tamm, A. Saltreducing in cooked ham by using high pressure processing/ A. Tamm, T. Bolumar, B. Bajovic, S. Toepfl, V. Heinz // *59th International Congress of Meat Science and Technology*. — 2013. — Izmir, Turkey, — S10A-66.
- Pietrasik, Z. The use of high pressure processing to enhance the quality and shelf life of reduced sodium naturally cured restructured cooked hams / Z. Pietrasik, N.J.Gaudette, S.P. Johnston // *Meat Science*. — June 2016. — Vol. 116. — P. 102–109.
- De Lamballerie-Anton, M. Effect of HPP on the digestibility of meat and soya beans proteins/ M. De Lamballerie-Anton, S. Delepine, N.Chapleau // *In Proceedings XXXIX European High Pressure Research Meeting*, — 16–19 September 2001, — Santander, Spain. — P. 59.
- Balny, C. High pressure and protein oligomeric dissociation // *In Proceedings XXXIX European High Pressure Research Meeting*, — 16–19 September 2001, — Santander, Spain. — P. 37.
- Hugas, M. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology/ M. Hugas, M. Garriga, J.M. Monfort // *Meat Science*. — 2002. — Vol. 62. — P. 359–371.
- Oehmigen, K. The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids/ K. Oehmigen, M. Hahnel, R. Brandenburg, C. Wilke, K. D. Weltmann, T. von Woedtke // *Plasma Processes and Polymers*. — 2010. — 7. — P. 250–257
- Jung S., The addition of nitrite to processed meats by plasma-treated water/ S. Jung, Joo Kim Hyun, Sanghoo Park, Hae In Yong, Wonho Choe, Cheorun Jo // *61th International Congress of Meat Science and Technology*. — 2015. — Clermont-Ferrand (FRANCE).
- Frasch-Melnik, S. Fat crystal-stabilised w/o emulsions for controlled salt release/ S. Frasc-Melnik, I.T. Norton // *Journal of Engineering*. — 2010. — Vol. 98. — P. 437–442.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

### Принадлежность к организации

**Туниева Елена Карленовна** — кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26.  
Тел.: 8-495-676-71-11  
E-mail: lenatk@bk.ru

**Горбунова Наталия Анатольевна** — кандидат технических наук, ученый секретарь, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26.  
Тел.: 8-495-676-93-17  
E-mail: ngorbunova@vniimp.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 01.03.2017

## AUTHOR INFORMATION

### Affiliation

**Tunieva Elena Karlenovna** — candidate of technical sciences, leading research scientist, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: 8 -495-676-71-11  
E-mail: lenatk@bk.ru

**Gorbunova Nataliya Anatolyevna** — candidate of technical sciences, Scientific secretary, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: 8 -495-676-93-17  
E-mail: ngorbunova@vniimp.ru

### Contribution

Authors in equal shares are related to writing of the manuscript and equally bear responsibility for plagiarism.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 01.03.2017

# THE STUDY OF THE INFLUENCE OF MODEL MEAT SYSTEMS ON THE ALLERGIC IMMUNE RESPONSE IN VIVO

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МОДЕЛЬНЫХ МЯСНЫХ СИСТЕМ НА АЛЛЕРГИЧЕСКУЮ РЕАКЦИЮ ИММУНИТЕТА IN VIVO

Dydykin A.S., Minaev M.Y., Tolmacheva G.S., Musatova A.A.  
The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute, Moscow, Russia

**Ключевые слова:** пищевая аллергия, лабораторные животные, сывороточный альбумин, ферменты, гематологические показатели, иммуноферментный анализ.

**Keywords:** food allergy, laboratory animals, serum albumin, enzymes, hematological parameters, enzyme-linked immunosorbent assay.

### Аннотация

В данной статье представлены результаты изучения влияния гомогенных мясных модельных систем, полученных с применением ферментного препарата грибной протеазы и микробиологической стартовой культуры *Lactobacillus plantarum*, на аллергическую реакцию специфического иммунитета *in vivo*. По результатам исследований установлено, что опытные продукты не оказывают негативного влияния на клиническое состояние лабораторных животных. На протяжении эксперимента динамика изменения массы тела животных всех групп была положительной, при введении опытных образцов в рацион, отмечены меньший прирост веса крыс и меньшие значения привесов животных в конце эксперимента (у крыс 1 группы — 14,0%, 2 группы — 15,9%, у животных 3 группы — 20,2%). Возможно это связано с адаптационными процессами, происходящими в ответ на введение в рацион мясных систем, что подтверждает нивелирование ежесуточного привеса опытных и интактных животных начиная с 16-х суток эксперимента. По результатам общего клинического анализа крови животных, потреблявших опытные продукты, выявлено увеличение лейкоцитов и лимфоцитов до 18%, гранулоцитов до 35% и моноцитов до 8%, концентрации гемоглобина, уровня гематокрита и средней концентрации гемоглобина в эритроците свыше 3%, ширины распределения эритроцитов и среднего объема эритроцита до 2% по сравнению с интактными животными. Соотношение этих данных с анализом иммуноферментных показателей сыворотки крови опытных животных (гистамин и иммуноглобулин E) позволило высказать предположение об экспрессии реактивных антител и взаимодействии на поверхности базофилов и тучных клеток, приводящих к дегрануляции и высвобождению (увеличению) гистамина, как vasoактивного фактора, на 40% в сравнении с интактной группой. Общий вывод исследований указывает на то, что опытные мясные модельные системы могут вызывать активацию специфических иммунных реакций у лабораторных животных. Возможно, это связано с образованием под действием протеаз большого количества сложноусваиваемых полипептидных и пептидных соединений, вызывающих местные адаптационные реакции.

### Abstract

This article presents the results of studying the effect of homogeneous model meat systems produced using enzyme preparation containing fungal protease and microbiological starter culture of *Lactobacillus plantarum* on the allergic reactions within specific immunity *in vivo*. According to the results, it is established that experimental products have no negative effect on the clinical parameters of laboratory animals. During the experiment, with the introduction of experimental products into diet, the dynamics of body weight changes in all groups of animals was positive. At the end of the experiment, there were smaller increase in the weight of rats and lower values of weight gain (Group 1 — 14.0%, Group 2 — 15.9%, Group 3 — 20.2%). This is possibly due to the adaptation processes occurring in response to introduction of meat systems into the diet, which confirms the leveling of the daily weight gain of experimental and intact animals since the 16th day of the experiment. According to the results of clinical blood analysis of the animals consuming experimental products, an increase is detected in leukocytes and lymphocytes by up to 18%; in granulocytes by up to 35%; and in monocytes by up to 8%; in hemoglobin concentration, hematocrit and mean corpuscular hemoglobin concentration by more than 3%; in red cell distribution width and mean corpuscular volume by up to 2%, in comparison with intact animals. The correlation of these data with ELISA parameters for serum of experimental animals (histamine and immunoglobulin E) allowed to suggest the expression of reaginic antibodies and interaction on the surface of basophils and mast cells, which led to the degranulation and release (increase) of histamine, as a vasoactive factor, by 40% compared with intact animals. The overall conclusion of the studies is that experimental model meat systems may trigger the activation of specific immune responses in laboratory animals. This is possibly due to protease-mediated formation of greater amount of indigestible polypeptides and peptides that invoke local adaptation responses.

### Введение

На сегодняшний день проблемы аллергии составляют значительную часть среди заболеваний неинфекционного происхождения. В структуре данной

### Introduction

To date, allergy problems account for a significant proportion of non-infectious diseases. Among them, food allergy has leading positions. This pathology is especially

патологии пищевая аллергия занимает лидирующие позиции. Особое значение данная патология имеет для детей раннего возраста, так как в силу не зрелости ферментных систем желудочно-кишечного тракта организм ребенка не всегда способен расщеплять пищевые субстраты до полуэлементных и элементных нутриентов, которые безопасно включаются в метаболизм [1]. У большинства детей, особенно проживающих в городах, хотя бы раз была аллергическая реакция на пищевой ингредиент, макро- или микрокомпонент, причем у 30 % детей аллергические проблемы приобретают хронический характер.

Одним из законодательных (нормативных) документов, подтверждающих актуальность и распространённость пищевой аллергии, является принятый Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки». Статья 4 «Требования к маркировке пищевой продукции» данного документа устанавливает требования, обязывающие производителя указывать в составе пищевой продукции компоненты (в том числе пищевые добавки, ароматизаторы), биологически активные добавки, употребление которых может вызвать аллергические реакции или противопоказано при отдельных видах заболеваний. Причем количество потенциальных аллергенов должно указываться независимо от их количества.

Согласно ТР ТС 022/2011, к наиболее распространенным компонентам, употребление которых может вызвать аллергические реакции или противопоказано при отдельных видах заболеваний, относятся:

- арахис и продукты его переработки;
- аспартам и аспартам-acesульфам соль;
- горчица и продукты ее переработки;
- диоксид серы и сульфиты, если их общее содержание составляет более 10 миллиграммов на один килограмм или 10 миллиграммов на один литр в пересчете на диоксид серы;
- злаки, содержащие глютен, и продукты их переработки;
- кунжут и продукты его переработки;
- люпин и продукты его переработки;
- моллюски и продукты их переработки;
- молоко и продукты его переработки (в том числе лактоза);
- орехи и продукты их переработки;
- ракообразные и продукты их переработки;
- рыба и продукты ее переработки (кроме рыбного желатина, используемого в качестве основы в препаратах, содержащих витамины и каротиноиды);
- сельдерей и продукты его переработки;
- соя и продукты ее переработки;
- яйца и продукты их переработки.

Конечно, данный перечень не является исчерпывающим и как правильно отмечено — это наиболее распространенные компоненты, так как у детей,

important for young children, because child's body is not always able to split food substrates into safely metabolized semi-elemental and elemental nutrients [1], due to immaturity of the enzyme systems of gastrointestinal tract. Most children, especially those who live in cities, had at least one allergic reaction to food ingredient, macro- or micro-component, and in 30 % of children allergic problems become chronic.

One of the regulative documents confirming relevance and prevalence of food allergy is the adopted Technical Regulations of the Customs Union TR TS 022/2011 «Food products in terms of its labeling.» Article 4 «Requirements for labeling of food products» of this document establishes requirements for manufacturer to indicate components of food products (including food additives, flavoring agents), bioactive additives, which consumption may cause allergic reactions or is contraindicated in certain types of diseases. Moreover, the number of potential allergens should be indicated regardless of their number.

According to TR TS 022/2011, the most common components, which consumption may cause allergic reactions or is contraindicated in certain types of diseases, include the following:

- peanuts and related processed products;
- aspartame and aspartame-acesulfame salt;
- mustard and related processed products;
- sulfur dioxide and sulfites, if their total content is greater than 10 milligrams per kilogram or 10 milligrams per liter based on sulfur dioxide;
- cereals containing gluten and related processed products;
- sesame and related processed products;
- lupine and related processed products;
- shellfish and related processed products;
- milk and related processed products (including lactose);
- nuts and related processed products;
- crustaceans and related processed products;
- fish and related processed products (excluding fish gelatin used as a base in preparations containing vitamins and carotenoids);
- celery and related processed products;
- soybeans and related processed products;
- eggs and related processed products.

Of course, this list is not complete, and as it is correctly noted, these are the most common components, since in

особенно раннего возраста, аллергические реакции могут вызывать и другие пищевые источники, в том числе мясо [2]. В мясе животных имеется два основных потенциальных аллергена — сывороточный альбумин и гамма-глобулин [3]. При острой чувствительности на эти вещества, у детей может наблюдаться нарушение функционирования желудочно-кишечного тракта (рвота, понос, расстройство желудка), выступить сыпь, ощущаться зуд на разных участках тела, возникнуть аллергический ринит (насморк) и даже приступы удушья (анафилаксии) [4, 5]. Сывороточный альбумин — наиболее широко изученный и наиболее распространенный протеин крови (70 % от общего протеинового состава). Его концентрация в плазме составляет 35–55 мг/мл. Бычий сывороточный альбумин (BSA) представляет собой глобулу в форме сплюснутого эллипсоида вращения с полуосями 17 на 42 ангстрем, состоящую из 607 аминокислотных остатков. BSA обладает достаточно сложной пространственной структурой, образующей три домена, каждый из которых, в свою очередь подразделяется на два поддомена (A-B и C). Молекулярная масса BSA ~ 69 кДа.

Пищевой аллергией, как правило, болеет 15–40 % детей, начиная с раннего возраста. При этом в последние годы значительно увеличился процент детей, страдающих пищевой аллергией к коровьему молоку, а также к говяжьему мясу, так как эти продукты имеют антигенное сродство входящих в их состав белков [6]. Ограничение или исключение этих продуктов из питания детей, создает большие трудности в обеспечении физиологической потребности в белке животного происхождения, что чрезвычайно важно для их нормального роста и развития.

В связи с этим, на сегодняшний день ассортимент продуктов, обладающих пониженной аллергенностью, в основном представлен искусственными смесями на основе белков молока и сои [7, 8, 9, 10, 11]. Низкоаллергенные продукты на мясной основе отечественных (торговые марки «Тема», «Бабушкино лукошко», «Агуша», «Фруто-няня») и зарубежных производителей (компании «Nestlé», «Gerber», «Heinz») представлены консервами, изготовленными из различных видов мяса (конины, кролик, индейка), обладающих низким риском сенсибилизации у детей раннего возраста при их потреблении. Применение этих продуктов в диетических рационах детей, страдающих пищевой непереносимостью, свидетельствует о высокой эффективности [12, 13, 14]. Существует несколько технологических способов снижения аллергенности основных продуктов питания за счет полной или значительной элиминации сенсибилизирующих веществ:

- гидролиз — биотрансформация аллергена (получение гидролизатов молочных, растительных белков);
- тепловая обработка — варка, бланширование (производство мясных и рыбных продуктов);

children, especially those of early age, allergic reactions may be caused by other food sources, including meat [2]. Animal meat contains two main potential allergens — serum albumin and gamma globulin [3]. Acute sensitivity to these substances in children may cause gastrointestinal disorders (vomiting, diarrhea, indigestion), rash, itching at different parts of the body, allergic rhinitis and even asthma attack (anaphylaxis) [4, 5]. Serum albumin is the most widely studied and most abundant blood protein (70 % of total protein composition). Its plasma concentration is 35–55 mg/ml. Bovine serum albumin (BSA) is a globule in the form of oblate spheroid with 17 semi-axes to 42 angstroms consisting of 607 amino acid residues. BSA has the complex spatial structure of three domains, each of which, in turn, is divided into two subdomains (A-B and C). The molecular weight of BSA is ~69 kDa.

Food allergy, as a rule, affects 15–40 % of children starting from an early age. In recent years, the percentage of children suffering from food allergy to cow's milk and beef has increased significantly, since these products have antigenic affinity for proteins in their composition [6]. Restricting or excluding these foods from the nutrition of children creates great difficulties to meet physiological need for animal protein, which is extremely important for their normal growth and development.

In this regard, the range of products with reduced allergenic potential is currently represented mainly by artificial mixtures of milk and soy proteins [7, 8, 9, 10, 11]. Low-allergenic meat-based products of domestic («Tio-ma», «Babushkino Lukoshko», «Agusha», «Fruto-Niania» trademarks) and foreign producers (Nestlé, Gerber, Heinz companies) are presented by canned food made of different meat types (horse meat, rabbit, turkey) with low risk of sensitization in small children. The use of these products in diets of children suffering from food intolerance demonstrates high efficiency [12, 13, 14]. There are several technological approaches to reduce allergenic potential of basic food products by total or significant elimination of sensitizing substances:

- hydrolysis, i.e. allergen biotransformation (obtaining hydrolysates of milk proteins and plant proteins);
- heat treatment, i.e. boiling, blanching (production of meat and fish products);

- фильтрация — удаление аллергена (производство молочных продуктов, соков);
- сочетание способов (получение смесей на основе молочных, растительных белков).

В этой связи чрезвычайно актуальной становится задача по созданию технологии новых продуктов детского питания на основе мясного сырья, обладающего гипоаллергенными свойствами. При этом, учитывая особенности мясного сырья и технологии его переработки, перспективными являются комбинированные способы снижения аллергенности, включающие в себя ферментацию и тепловую обработку.

Таким образом, целью данной работы было изучение влияния гомогенизированных мясных продуктов, обработанных ферментными препаратами на аллергическую реакцию иммунитета лабораторных животных.

### Материалы и методы

Исследование выполнено в ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова» на базе Экспериментальной Клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения.

Эксперимент проведен на клинически здоровых сексуально наивных лабораторных крысах spf-категории стока Wistar, массой ( $348 \pm 17$ ) г, полученных из Центра генетических ресурсов лабораторных животных Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ЦГР ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

До проведения эксперимента животные проходили адаптацию к лабораторным условиям в течение 14 суток. На протяжении всего эксперимента крысы содержались в системе индивидуально-вентилируемых клеток (ИВК) в составе вентиляционного блока VENT II и стеллажа с клетками типа Bio.A.S. тип III (EHRET, Германия), обеспечивающей создание оптимального микроклимата в каждой отдельной клетке. Условия содержания крыс в ИВК были сходные в отношении температуры ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ), влажности (50–60%), освещения 12/12 (с 6.00 до 18.00 световой день).

На протяжении эксперимента крысы потребляли полнорационный комбикорм *ad libitum* (Ассортимент-Агро, Россия) по ГОСТ Р 50258–92, сбалансированный по белку, пищевая ценность которого представлена в таблице 1.

Питьевую воду для поения лабораторных животных получали на установке водоподготовки EMD Millipore RiOs™ 50 (Merc Millipore, Германия), минерализацию осуществляли путем добавления минеральных солей для получения физиологически полноценного минерального состава (минерализация 314–382 мг/л: гидрокарбонаты — 144–180, сульфаты — <1, хлориды — 60–76, кальций — 6, магний — 3, натрий — 50–58, калий — 50–58). Температура воды для поения составляла 10–12 °C.

- filtering, i.e. removing the allergen (production of dairy products, juices);
- combination of different methods (preparation of mixtures based on dairy and vegetable proteins).

In this context, an extremely urgent task arises in terms of creating a new technology for baby foods based on meat raw materials with hypoallergenic properties. In this case, given the characteristics of meat raw materials and processing technologies, combined approaches to reduce allergenic potential, including fermentation and heat treatment, are becoming fairly promising.

Thus, the aim of this study was to investigate the influence of homogenized meat products treated with the enzyme preparation on the allergic immune response in laboratory animals.

### Materials and methods

The study was carried out by The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute at the Experimental Clinic-Laboratory of Biologically Active Substances of Animal Origin.

The experiment was carried out on clinically healthy, sexually naive laboratory Wistar rats of spf-category with weight of  $348 \pm 17$  g obtained from the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals in Federal Research Center of the Cytology and Genetics Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk.

Before the experiment, the animals underwent adaptation to the laboratory conditions for 14 days. Throughout the experiment, the rats were kept in a system of individually ventilated cages (IVC) as part of the VENT II ventilation unit and Type III Bio.A.S. cage rack (EHRET, Germany) ensuring optimal microclimate in each individual cage. The conditions of rats in IVC were similar as for temperature ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ), humidity (50–60%), illumination 12/12 (6.00 to 18.00 light day).

Throughout the experiment, rats were fed *ad libitum* with all-in-one mixed feed balanced by protein (Assortiment-Agro, Russia) according to GOST R 50258–92. Nutritional value of mixed feed is presented in Table 1.

Drinking water for laboratory animals was obtained at EMD Millipore RiOs™ 50 water treatment plant (Merc Millipore, Germany). Mineralization was carried out by adding mineral salts to obtain physiologically optimal mineral composition (mineralization 314–382 mg/L: hydrogen carbonates — 144–180, sulfates — <1, chlorides — 60–76, calcium — 6, magnesium — 3, sodium — 50–58, potassium — 50–58). Drinking water temperature was 10–12 °C.

Table 1. Nutritional value of mixed feed | Табл. 1. Пищевая ценность комбикорма

Parameter   Наименование показателя	Contents   Содержание
Energy, not less than, kkal/100 g   Обменная энергия не менее, ккал/100 г	300
Crude protein, not less than, %   Сырой протеин не менее, %	20
Crude fat, not less than, %   Сырой жир не менее, %	5
Crude fiber, not more than, %   Сырая клетчатка не более, %	4
Ash, not more than, %   Зола не более, %	7
Calcium, not less than, %   Кальций не менее, %	0.9
Phosphorus, not less than, %   Фосфор не менее, %	0.6
Lysine, not less than, % based on dry matter   Лизин не менее, % на а.с.в.	1.2
Methionine-cystine, not less than, % based on dry matter   Метионин-цистин не менее, % на а.с.в.	0.7
Vitamin A 1000, IU/kg   Витамин А 1000, МЕ/кг	45
Vitamin E, mg/kg   Витамин Е, мг/кг	202
Vitamin D3, 1000 IU/kg   Витамин Д3, 1000 МЕ/кг	2.48
K3, mg/kg   К3, мг\кг	18
B1, mg/kg   В1, мг\кг	76
B2, mg/kg   В2, мг\кг	32
B3, mg/kg   В3, мг\кг	126
B4, mg/kg   В4, мг\кг	2700
B5, mg/kg   В5, мг\кг	129
B6, mg/kg   В6, мг\кг	28
Bc, mg/kg   Вc, мг\кг	64
B12, mg/kg   В12, мг\кг	0.13
C, mg/kg   С, мг\кг	113
H, mg/kg   Н, мг\кг	0.54
Manganese, mg/kg   Марганец, мг\кг	91
Zinc, mg/kg   Цинк, мг\кг	86
Iron, mg/kg   Железо, мг\кг	162
Copper, mg/kg   Медь, мг\кг	14
Iodine, mg/kg   Иод, мг\кг	1.9
Cobalt, mg/kg   Кобальт, мг\кг	1.8
Selenium, mg/kg   Селен, мг\кг	0.27

Технологическая схема изготовления модельных мясных продуктов представлена на рис. 1. Пунктирными стрелками показан процесс изготовления контрольных образцов мясных продуктов.

После адаптационного периода, животных индивидуально маркировали и распределяли на группы случайным образом:

1 группа — контрольные животные, потреблявшие контрольные образцы мясных продуктов;

2 группа — животные, потреблявшие на протяжении эксперимента опытные образцы мясных продуктов, обработанных ферментным препаратом и молочнокислыми бактериями;

3 группа — интактные животные, потреблявшие на протяжении эксперимента комбикорм.

Исследуемые модельные мясные продукты вводили в количестве 50 % от общего белка рациона, рационы крыс 1–3 групп были сбалансированы по белку.

The technological flow chart for model meat product manufacturing is shown in Fig. 1. The dashed arrows indicate the process of control samples production.

After the adaptation period, the animals were individually labeled and randomly assigned to different groups:

Group 1 — control animals consumed control samples of meat products;

Group 2 — animals consumed experimental meat products treated with enzyme preparation and lactic acid bacteria;

Group 3 — intact animals consumed mixed feed.

The studied model meat products were introduced in the amount of 50 % of total protein in the diet; rat diets in all groups were well-balanced by protein.

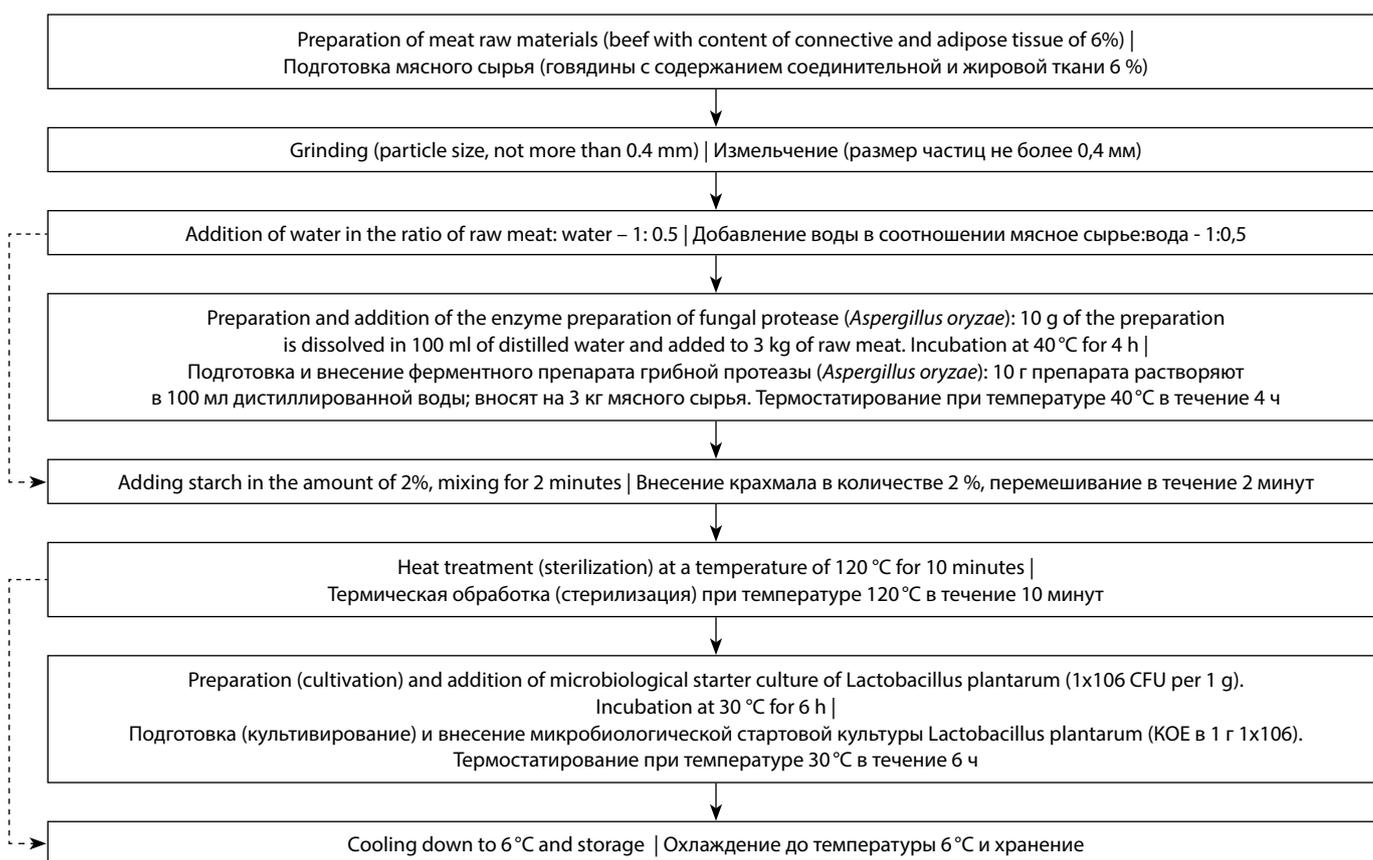


Figure 1. Technological flow chart for the production of model meat systems

Рис. 1. Технологическая схема изготовления модельных мясных продуктов

Эксперимент проводился в течение 28 суток. Наблюдение за животными осуществляли ежедневно в течение всего эксперимента. Регистрировали клинический статус и поведение животных, состояние нервномышечных функций, шерстного покрова, поедание корма, потребление воды. До начала исследования и через каждые 3-е суток исследования проводили взвешивание животных на электронных лабораторных весах (Ohaus, США) для составления диаграммы привесов.

По окончании эксперимента, животных усыпляли в камере для эвтаназии (VetTech, Великобритания) с помощью углекислого газа, после чего проводили отбор крови и общую аутопсию.

Общее клиническое исследование проб крови проводили на автоматическом ветеринарном гематологическом анализаторе Abacusjuniorvet 2.7 (Diatron Messtechnik GmbH, Австрия), используя наборы реактивов компании Diatron. В крови животных определяли 14 показателей: лейкоциты (WBC); лимфоциты (LYM); содержание смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток (MID); гранулоциты (GRA); лимфоциты (LY); миелоциты (MI); относительное содержание гранулоцитов (GR); эритроциты (RBC); гемоглобин (HGB); гематокрит (HCT); средний объем эритроцита (MCV); среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH); среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитах (MCHC); ширину распределения эритроцитов (RDWc).

Иммуноферментные показатели (иммуноглобулин E, гистамин) определяли на анализаторе Immunochem

The experiment lasted 28 days. Observation of the animals was carried out daily throughout the experiment. Clinical parameters and behavior of animals, neuromuscular functions, hair condition, feed intake, and water consumption were recorded. Prior to the study and every 3 days of the study, animals were weighed on an electronic laboratory scale (Ohaus, USA) to plot weight gain chart.

At the end of the experiment, the animals were euthanized in an euthanasia cage (VetTech, UK) with carbon dioxide followed by blood sampling and general autopsy.

A general clinical study of blood samples was performed on an Abacus Junior Vet 2.7 automatic veterinary hematology analyzer (Diatron Messtechnik GmbH, Austria) using Diatron reagent kits. In the blood of animals, 14 indicators were determined: white blood cells (WBC); lymphocytes (LYM); total content of monocytes, eosinophils, basophils and immature cells (MID); granulocytes (GRA); lymphocytes (LY); myelocytes (MI); relative content of granulocytes (GR); erythrocytes (RBC); hemoglobin (HGB); hematocrit (HCT); mean corpuscular volume (MCV); mean corpuscular hemoglobin (MCH); mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); red cell distribution width (RDWc).

ELISA parameters (immunoglobulin E, histamine) were determined on Immunochem 2100 analyzer (USA)

2100 (USA) при помощи «сэндвич» — метода, используя наборы видоспецифичных реактивов ELISA (rat).

Содержание, питание, уход за животными, манипуляции, выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями Приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», требованиями Приказа МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», Международными правилами гуманного обращения с животными — Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза.

Для обработки результатов использовалась программа STATISTICA 10. Результаты представлялись в виде «Взвешенное среднее значение ± Стандартное отклонение». Статистическая достоверность рассчитывалась с применением однопараметрического ANOVA теста с применением критерия Дункана. Вероятность 0,05 была выбрана в качестве значимого уровня.

### Результаты и обсуждение

Проведенными ранее исследованиями установлено, что наибольшей видоспецифической активностью в отношении изучаемого субстрата (БСА) обладает ферментный препарат грибной протеазы, содержащий комплекс пептидаз и протеиназ, полученный путем направленной ферментации селекционного штамма *Aspergillus oryzae* с последующей очисткой [15, 16]. Данный препарат осуществляет гидролиз белковых веществ до аминокислот и пептидов более низкого молекулярного веса [17]. Однако, получаемые после ферментативной обработки продукты обладали низкими органолептическими показателями. С целью улучшения органолептических показателей, а также более полной биотрансформации БСА в мясном сырье, использовали молочнокислые микроорганизмы. Полученные экспериментальные данные фракционного состава белков указывали на отсутствие в исследуемых образцах белковой фракции бычьего сывороточного альбумина [18]. Таким образом, применение двухстадийной обработки мясного сырья позволило снизить аллергенность говядины за счет биотрансформации основного белка аллергена — БСА.

Состояние животных до начала эксперимента находилось в пределах физиологической нормы. Крысы были подвижны и активны; мышцы в тонусе; тактильная реакция сохранена; шерсть плотно прилегает к телу, не взъерошенная, гладкая, чистая, блестящая, кожный покров эластичный, без нарушения целостности; видимые слизистые покровы бледно-розового цвета, истечений и других признаков воспалительных реакций нет. Глаза ярко-красного цвета. Акты мочеиспускания и дефекации находились в пределах нормы. Крысы активно поедали корм, что подтверждает полное потребление предложенных образцов, как в контрольной, так и в опытной группах. Сохранность животных на протяжении эксперимента была 100 %.

by sandwich method using species-specific (rat) ELISA reagent kits.

Animal management, nutrition, care, manipulations, removal from the experiment were carried out in accordance with the requirements of the Ministry of Health of the Russian Federation Order No. 267 dated 19.06.2003 «On the approval of the laboratory practice rules», the requirements of the Ministry of Health of the USSR Order No. 742 dated 13.11.1984 «On the approval of the rules for work using experimental animals», the International Rules for animal protection — Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union.

STATISTICA 10 software was used to analyze the results. The results were presented as weighted average ± standard deviation. Statistical significance was calculated using one-way ANOVA test and Duncan test. The probability of 0.05 was chosen as a significant level.

### Results and discussion

Previous studies have shown that the enzyme preparation of fungal protease containing the complex of peptidases and proteases obtained by targeted fermentation with selected strain of *Aspergillus oryzae* followed by purification possesses the greatest species-specific activity with respect to studied substrate (BSA) [15,16]. This preparation hydrolyses protein substances to amino acids and peptides with lower molecular weight [17]. However, the products obtained after enzymatic treatment had low sensory parameters. To improve sensory quality, as well as to obtain more complete biotransformation of BSA in meat raw materials, lactic acid microorganisms were used. The experimental data obtained for the fractional composition of proteins indicated the absence of bovine serum albumin fraction in the samples [18]. Thus, the use of two-stage processing of meat raw materials allowed reducing the allergenic potential of beef due to biotransformation of the main allergenic protein — BSA.

The condition of the animals prior to the experiment beginning was physiologically normal. The rats were mobile and active; muscles were in tonus; tactile response was active; hair tightly adhered to body, not ruffled, smooth, clean, shiny; the skin was elastic, without compromising integrity; visible mucous membranes were pale pink, without efflux and other signs of inflammatory reactions. Eyes were bright red. Urination and defecation were within normal limits. Rats actively ate feed, which confirms full consumption of the proposed samples, both in control and experimental groups. Animal survival throughout the experiment was 100 %.

В течение всего периода наблюдения за животными не было отмечено существенных признаков изменения клинического состояния. Введение в рацион исследуемых образцов не сказывалось на поведении, состоянии кожи, шерстного покрова и видимых слизистых оболочек подопытных животных, также различий в потреблении корма и воды отмечено не было.

Динамика массы тела животных на протяжении эксперимента была положительной. Показано равномерное увеличение массы животных 1-й и 2-й групп в среднем 2–2,6 г/сутки, при этом, интактные крысы 3 группы набирали вес более интенсивно — прирост массы был достоверно выше и составлял 3,3–3,6 г/сутки (рисунок 2).

Максимальные привесы отмечены у интактных животных 3 группы составили 20,2%, у крыс 2-й группы, потреблявших опытный образец мясных систем — 15,9%, у животных 1-й группы — 14,0%, по отношению к исходной массе животных.

При анализе результатов гематологического исследования крови (таблица 2) крыс 2 группы, потреблявших опытный образец, показано достоверное увеличение лейкоцитов и лимфоцитов до 18%, гранулоцитов (до 35%) и моноцитов (до 8%,  $P > 0,05$ ) по сравнению с интактными животными 3-й группы. Стоит отметить, что у животных 1 группы отмечалось снижение относительного содержания лимфоцитов и моноцитов уменьшилось на 4,9% и 35,0%, соответственно, при этом выявлено увеличение доли гранулоцитов (до 30%), по отношению к животным 3-й группы ( $P < 0,05$ ).

У крыс 1-й группы наблюдалось достоверное незначительное снижение концентрации гемоглобина (до 4%), уровня гематокрита и средней концентрации гемоглобина в эритроцитах (до 2%), при увеличении ширины распределения эритроцитов на 3,6%, относительно показателей животных 3-й группы. У животных 2-й группы, по сравнению с интактными крысами, отмечено увеличение концентрации гемоглобина, уровня гематокрита и средней концентрации гемоглобина в эритроците свыше 3%. Ширина распределения эритроцитов и средний объем эритроцита у животных 1 и 2 групп превышали значения интактных крыс 3 группы (на 2%,

During the entire period of observation, there were no significant signs of changes in clinical parameters of the animals. The introduction of the samples into diets did not affect behavior, skin condition, hair and visible mucous membranes of the experimental animals, as well as there were no differences in feed intake and water consumption.

The dynamics of body weight throughout the experiment was positive. A uniform weight gain is shown for the animals in Groups 1 and 2 on the average by 2–2.6 g/day, while intact rats in Group 3 increased their weight more intensively — the weight gain was significantly higher and accounted for 3.3–3.6 g/day (Figure 2).

The maximum weight gain was observed in the intact animals of Group 3 and accounted for 20.2%; the animals in Group 2 consuming experimental meat products increased their weight by 15.9%, and rats in Group 1 — by 14.0% compared to initial weight of the animals.

Analysis of hematological test results (Table 2) for the rats in Group 2 consuming experimental feed showed a significant increase in leukocytes and lymphocytes by up to 18%, granulocytes by up to 35% and monocytes by up to 8% ( $P > 0.05$ ) compared to the intact animals in Group 3. In Group 1 there was a decrease in the relative content of lymphocytes and monocytes, 4.9% and 35.0% respectively, while the proportion of granulocytes increased (up to 30%) in comparison to the animals in Group 3 ( $P < 0.05$ ).

The rats in Group 1 had an insignificant decrease in the hemoglobin concentration (up to 4%), hematocrit and mean corpuscular hemoglobin concentration (by up to 2%), with an increase in red cell distribution width by 3.6% compared to the parameters of animals in Group 3. The rats in Group 2 had an increase in hemoglobin concentration, hematocrit and mean corpuscular hemoglobin concentration by more than 3% in comparison with intact rats. The red cell distribution width and mean corpuscular volume in animals of Groups 1 and 2 exceeded the values in

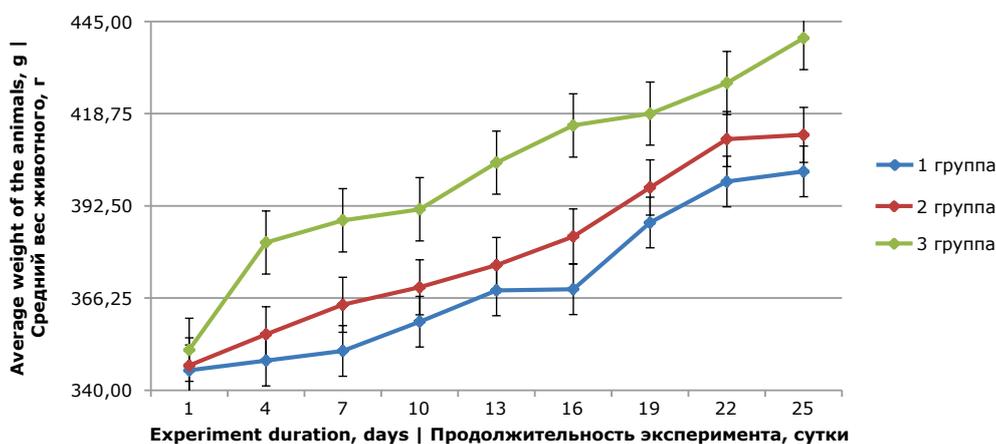


Figure 2. Dynamics in animal weight changes during the experiment

Рис. 2. Динамика изменения массы животных в процессе эксперимента

$P < 0,05$ ). Стоит отметить, что данные показатели животных 1-й группы были максимально приближены к показателям животных 3-й группы (Таблица 2).

Иммуноферментный анализ сыворотки крови крыс показал, что потребление контрольного образца мясных систем животными 1-й группы не приводило к достоверному изменению концентраций иммуноглобулина E относительно интактных животных 3-й группы. Отмечено, что внесение в рацион животных 2-й группы опытного образца приводило к незначительному увеличению концентрации иммуноглобулина E на 4,5 % ( $P < 0,05$ ) по отношению к животным 1-й группы и на 4,9 % ( $P > 0,05$ ) по отношению к животным 3-й группы. В отношении гистамина отмечено значительное его увеличение в сыворотке крыс 1-й (на 27 %) и 2-й (до 40 %) групп ( $P < 0,05$ ), относительно животных 3-й группы. При этом содержание гистамина в сыворотке крови животных 2-й группы было на 11,1 % ( $P < 0,05$ ) выше относительно показателя животных 1-й группы (Таблица 3).

По результатам аутопсии и макроскопического исследования изучаемых органов животных, различий между группами животными, получавшими разные рационы, не установлено.

intact rats of Group 3 (by 2 %,  $P < 0,05$ ). It is worth noting that these indicators of the animals in Group 1 were as close as possible to those of the animals in Group 3 (Table 2).

ELISA analysis of rat serum showed that consumption of the control meat products by animals in Group 1 did not mediate a significant change in the immunoglobulin E concentrations compared to the intact animals in Group 3. It was noted that introduction of the experimental meat product into the diet of the animals in Group 2 resulted in an insignificant increase in the immunoglobulin E concentration by 4.5 % ( $P < 0,05$ ) compared to the intact animals in Group 1 and by 4.9 % ( $P > 0,05$ ) compared to the intact animals in Group 3. There was a significant histamine increase in rat serum in Group 1 (27 %) and in Group 2 (up to 40 %) ( $P < 0,05$ ) compared to the intact animals in Group 3. While the histamine level in serum of the animals in Group 2 was 11.1 % ( $P < 0,05$ ) higher compared to the rats in Group 1 (Table 3).

According to the autopsy results and macroscopic study of animal organs, differences between the animal groups receiving different diets have not been established.

Table 2. Hematological analysis of animal blood | Табл. 2. Гематологический анализ крови животных

Parameters   Показатели	Normal values   Нормы	Group 1 (control)   1 группа (Контрольная)	Group 2 (experimental)   2 группа (Опытная)	Group 3 (intact)   3 группа (Интактная)
Leukocytes, $10^9/L$   Лейкоциты, $10^9/л$	6.6–12.6	7.25±0.52	9.64±0.53 <sup>#</sup>	8.18±0.61
Lymphocytes, $10^9/L$   Лимфоциты, $10^9/л$	4.78–9.12	5.6±0.41	7.55±0.43 <sup>#</sup>	6.55±0.46
Total content of monocytes, eosinophils, basophils and immature cells, $10^9/L$   Содержание смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток, $10^9/л$	0.04–0.39	0.16±0.03	0.29±0.05 <sup>#</sup>	0.27±0.03
Granulocytes, $10^9/L$   Гранулоциты, $10^9/л$	1.00–3.38	1.49±0.12	1.80±0.16 <sup>*</sup>	1.33±0.12
Lymphocytes, %   Лимфоциты, %	66.6–83.6	77.24±0.79 <sup>*</sup>	78.29±1.20 <sup>*</sup>	81.26±0.87
Monocytes, %   Моноциты, %	1.0–2.9	2.04±0.33 <sup>*</sup>	2.83±0.42	3.14±0.28
Relative content of granulocytes, %   Относительное содержание гранулоцитов, %	10.0–28	20.73±0.95 <sup>*</sup>	18.87±1.33	16.12±0.55
Erythrocytes, $10^{12}/L$   Эритроциты, $10^{12}/л$	7.07–9.65	8.76±0.07	8.86±0.06	8.92±0.08
Hemoglobin, g/L   Гемоглобин, г/л	137–176	149.3±1.3 <sup>*</sup>	154.1±0.9 <sup>#</sup>	155.2±1.0
Hematocrit, %   Гематокрит, %	39.6–52.5	43.67±0.42 <sup>*</sup>	45.31±0.30 <sup>#</sup>	44.67±0.33
Mean corpuscular volume, $\mu\text{m}^3$   Ср. объем эритроцита, $\mu\text{m}^3$	49–59	49.75±0.30	51.18±0.25 <sup>*#</sup>	50.10±0.33
Mean corpuscular hemoglobin, pg   Ср. содержание гемоглобина в эритроците, пг	17.8–20.9	17.05±0.07 <sup>*</sup>	17.39±0.08 <sup>#</sup>	17.43±0.11
Mean corpuscular hemoglobin concentration, g/L   Ср. концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/л	332–379	342.0±1.6 <sup>*</sup>	340.0±1.0 <sup>*</sup>	347.6±1.3
Red cell distribution width, %   Ширина распределения эритроцитов, %	10.5–15.2	16.33±0.09 <sup>*</sup>	16.04±0.09 <sup>*#</sup>	15.77±0.10

\* — significant difference from the intact group ( $P < 0,05$ ), # — significant difference from the control group ( $P < 0,05$ )

\* — достоверное отличие от интактной группы ( $P < 0,05$ ), # — достоверное отличие от контрольной группы ( $P < 0,05$ )

Table 3. ELISA results for serum of the animals | Табл. 3. Иммуноферментный анализ сыворотки крови животных

Parameters   Показатели	Group 1 (control)   1 группа (Контрольная)	Group 2 (experimental)   2 группа (Опытная)	Group 3 (intact)   3 группа (Интактная)
Histamine, ng/ml   Гистамин, нг/мл	70.95±2.30 <sup>*</sup>	78.85±2.76 <sup>*#</sup>	55.79±1.69
Immunoglobulin E, ng/ml   Иммуноглобулин E, нг/мл	56.87±1.44	59.42±1.40	56.65±1.48

\* — significant difference from the intact group ( $P < 0,05$ ), # — significant difference from the control group ( $P < 0,05$ )

\* — достоверное отличие от интактной группы ( $P < 0,05$ ), # — достоверное отличие от контрольной группы ( $P < 0,05$ )

## Выводы

Во время эксперимента не было отмечено существенных признаков изменения клинического состояния в опытной группе лабораторных животных. На протяжении всего эксперимента динамика изменения массы тела животных была положительной, при введении опытных образцов в рацион, отмечены меньший прирост веса крыс и меньшие значения привесов животных в конце эксперимента (у крыс 1 группы — 14,0 %, 2 группы — 15,9 %, у животных 3 группы — 20,2 %). Возможно это связано с адаптационными процессами, происходящими в ответ на введение в рацион мясных систем. Это предположение подтверждает то, что крысы 1-й и 2-й групп начиная с 16-х суток увеличивали вес в среднем на 3,4–3,7 г/сутки (достигая ежесуточного прироста интактных крыс 3-й группы).

По результатам общего клинического анализа крови животных, потреблявших опытный продукт, выявлено достоверное изменение концентраций иммунных клеток крови (увеличение лейкоцитов и лимфоцитов до 18 %, гранулоцитов до 35 % и моноцитов до 8 %); увеличение функциональной активности эритроцитов (увеличение концентрации гемоглобина, уровня гематокрита и средней концентрации гемоглобина в эритроците свыше 3 %, ширины распределения эритроцитов и среднего объема эритроцита до 2 %) по сравнению с интактными животными 3-й группы. Соотношение этих данных с анализом иммуноферментных показателей сыворотки крови (гистамин и иммуноглобулин E) позволяет высказать предположение об экспрессии реактивных антител (в том числе, IgE, повышающийся у крыс 2 группы до 4,5 %) и взаимодействии на поверхности базофилов и тучных клеток (увеличение числа лейкоцитов за счет лимфоцитов и гранулоцитов), приводящих к дегрануляции и высвобождению гистамина как вазоактивного фактора (увеличение содержания гистамина до 40 %) [19].

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно сделать вывод о том, что мясные модельные системы, полученные с использованием ферментного препарата грибной протеазы и микробиологической стартовой культуры *Lactobacillus plantarum*, могут вызывать активацию специфических иммунных реакций у лабораторных животных. Возможно, это связано с образованием под действием протеазы большего количества сложноусвояемых полипептидных и пептидных соединений, вызывающих местные адаптационные реакции [20, 21].

Для более точных сведений о возможных сенситизирующих или гипоаллергенных свойствах разрабатываемых модельных мясных систем будут проведены исследования, направленные на анализ протеомного и пептидного состава, биоусвояемости *in vitro*, с целью выявления антиалиментарных веществ, а также поиском специфических антител к сывороточному альбумину *in vivo*.

## Conclusion

During the experiment, there were no significant changes in the clinical parameters of the laboratory animals in the experimental group. Throughout the experiment, the dynamics of body weight changes was positive. With the introduction of the experimental products into the diet, a smaller increase in the weight and smaller values of animal weight gain at the end of the experiment were noted (14.0 % for the rats in Group 1, 15.9 % for the rats in Group 2, 20.2 % for the rats in Group 3). This is probably due to the adaptation processes occurring in response to the introduction of meat systems into the diet. This assumption is confirmed by the fact that, starting from the 16th day, the rats in Groups 1 and 2 increased their weight in average by 3.4–3.7 g/day (reaching daily weight gain of the intact rats in Group 3).

Based on the results of the clinical blood analysis for the animals consuming the experimental product, a significant change in the concentration of immune blood cells was revealed (an increase in leukocytes and lymphocytes by up to 18 %, granulocytes by up to 35 % and monocytes by up to 8 %); an increase in the functional activity of erythrocytes (an increase in hemoglobin concentration, hematocrit and mean corpuscular hemoglobin concentration by more than 3 %, the red cell distribution width and mean corpuscular volume by up to 2 %) compared with the intact animals in Group 3. The correlation of these data with serum ELISA analysis (histamine and immunoglobulin E) allows suggesting the expression of reaginic antibodies (including IgE, increasing in rats of Group 2 by up to 4.5 %) and interactions on the surface of basophils and mast cells (increase in leukocytes due to lymphocytes and granulocytes) leading to degranulation and release of histamine as a vasoactive factor (an increase in histamine by up to 40 %) [19].

Thus, based on the results, it can be concluded that model meat systems produced using the enzyme preparation of fungal protease and microbial starter culture of *Lactobacillus plantarum* may lead to the activation of specific immune responses in laboratory animals. This is possibly due to protease-mediated formation of a greater amount of indigestible polypeptides and peptides that invoke local adaptation responses [20, 21].

For more accurate information on the possible sensitizing or hypoallergenic properties of the model meat systems being developed, studies will be conducted to analyze the proteomic and peptide composition and bioavailability *in vitro*, to detect anti-nutritional substances, and to search for specific antibodies to serum albumin *in vivo*.

## Благодарность

Авторы статьи выражают благодарность и признательность заведующей Экспериментальной клиникой-лабораторией биологически активных веществ животного происхождения Всероссийского научно-исследовательского института мясной промышленности имени В.М. Горбатова Федуловой Л.В., научному сотруднику Котенковой Е.А. и младшему научному сотруднику Василевской Е.Р. за разработку дизайна эксперимента *in vivo* и проведение гематологических и иммуноферментных анализов крови лабораторных животных.

## Acknowledgment

The authors express their gratitude and appreciation to the head of the Experimental Clinic-Laboratory of Biologically Active Substances of Animal Origin of the V.M. Gorbatov All-Russian Meat Research Institute, L.V. Fedulova; research scientist, E. Kotenkova; and junior research scientist, Vasilevskaya E.R. for the development of *in vivo* experiment design, hematological and ELISA assay of laboratory animal blood.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Боровик, Т.Э. Диетотерапия при пищевой аллергии у детей раннего возраста / Т.Э. Боровик, В.А. Ревякина, С.Г. Макарова // Российский алергологический журнал (Приложение № 1). — 2005. — С. 28.
2. Ладодо, К.С. Руководство по лечебному питанию детей. — М.: Медицина. — 2000. — С. 384 (142–143).
3. Сажинов, Г.Ю. Обеспечение детского населения России высококачественными продуктами проблема национальной безопасности/ Г.Ю. Сажинов// Вопросы питания, — 1996. — № 5. — С. 4–5.
4. J. Bartra, J. Sastre, A. del Cuvillo et al. (2009). From Pollinosis to Digestive Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; Vol. 19, Suppl. 1: 3–10.
5. Restani P., Ballabio C., Tripodi S., Fiocchi A. (2009). Meat allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2009, 9(3), 265–269.
6. Taylor J.S., Erkek E. (2004). Latex allergy: diagnosis and management. *Dermatol. Ther.* 2004, 17(4). — P. 289–301.
7. L. Terracciano et al. (2002) Use of hydrolysates in the treatment of cow's milk allergy // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* — 2002. — Vol. 89, № 1. — P. 86–90.
8. D.J. Hill et al. (1999). The natural history of intolerance to soy and extensively hydrolyzed formula in infants with multiple food protein intolerance (MFPI) // *J. Pediatr.* — 1999. — Vol. 135. — P. 118–121.
9. Borovik, T.E. Experience of dietetic correction of allergy to cow's milk proteins in children of the first year of life / Borovik T.E., Revyakina V.A., Semenova N.N., Yatsyk G.V., Skvortsova V., Makarova S.G. // *Questions of children's dietology.* — 2005. — № 1. — P. 41–47.
10. Von Berg A., Koletzko S., Grubi A. et al. (2003). The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: the German infant nutritional intervention study, a randomized, double-blind trial // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2003. — № 11. — P. 533–540.
11. Von Berg A., Koletzko S., Filipiak-Pettröf B. et al. (2008). Preventive effect of hydrolyzed infant formulas persists until age 6 years: long term from the German infant nutritional intervention study (GINI) // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. 121 (60). — P. 1442–1447.
12. Ustinova A.V., Timoshenko N.V. Products for baby food based on meat raw materials. Tutorial. — М.: VNIIMP, — 2003, — P. 384.
13. Borovik T.E. Organization of healthy diet for children with food allergy. Materials of the VI-th All-Russian Conference «Healthy Nutrition» — М.: 2001. — P. 32–33.
14. Ladodo, K.S. Guidelines for the therapeutic nutrition of children. — М.: Медицина. — 2000, — P. 384 (18–20).
15. Rimareva, L.V. Effective enzyme preparation of proteolytic and hemicellulose action for processing areas of agro-industrial complex / L.V. Rimareva, M.B. Overchenko, E.M. Serba, K.L. Agashicheva // *Production of alcohol and alcoholic beverages.* — 2010. — № 4. — P. 14–16.
16. Serba, E.M. Effect of detergents on the secretion of intracellular enzymes from the biomass of *Aspergillus oryzae* fungus / E.M. Serba, M.B. Overchenko, L.V. Rimareva, Y.A. Borscheva // *Storage and processing of agricultural raw materials.* — 2011. — № 12. — P. 39–40.
17. Dydykin, A.S. Hypoallergenic products based on meat for young children / A.S. Dydykin, A.A. Gubina, E.I. Kurbatova // *Meat technologies* — 2015. — № 6. — P. 38–41.

## REFERENCES

1. Borovik, T.E. Dietotherapy for food allergies in young children / T.E. Borovik, V.A. Revyakina, S.G. Makarova // *Russian Allergological Journal (Appendix № 1)*, — 2005, — P. 28.
2. Ladodo, K.S. Guide to the therapeutic nutrition of children — М.: Medicine. — 2000. — P. 384 (142–143).
3. Sazhinov, G.Y. Providing the Russian children's population with high-quality products. The problem of national security / G.Y. Sazhinov // *Questions of nutrition*, — 1996. — № 5, — P. 4–5.
4. J. Bartra, J. Sastre, A. del Cuvillo et al. (2009). From Pollinosis to Digestive Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; Vol. 19, Suppl. 1: 3–10.
5. Restani P., Ballabio C., Tripodi S., Fiocchi A. (2009). Meat allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2009, 9(3), 265–269.
6. Taylor J.S., Erkek E. (2004). Latex allergy: diagnosis and management. *Dermatol. Ther.* 2004, 17(4). — P. 289–301.
7. L. Terracciano et al. (2002) Use of hydrolysates in the treatment of cow's milk allergy // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* — 2002. — Vol. 89, № 1. — P. 86–90.
8. D.J. Hill et al. (1999). The natural history of intolerance to soy and extensively hydrolyzed formula in infants with multiple food protein intolerance (MFPI) // *J. Pediatr.* — 1999. — Vol. 135. — P. 118–121.
9. Borovik, T.E. Experience of dietetic correction of allergy to cow's milk proteins in children of the first year of life / Borovik T.E., Revyakina V.A., Semenova N.N., Yatsyk G.V., Skvortsova V., Makarova S.G. // *Questions of children's dietology.* — 2005. — № 1. — P. 41–47.
10. Von Berg A., Koletzko S., Grubi A. et al. (2003). The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: the German infant nutritional intervention study, a randomized, double-blind trial // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2003. — № 11. — P. 533–540.
11. Von Berg A., Koletzko S., Filipiak-Pettröf B. et al. (2008). Preventive effect of hydrolyzed infant formulas persists until age 6 years: long term from the German infant nutritional intervention study (GINI) // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. 121 (60). — P. 1442–1447.
12. Ustinova A.V., Timoshenko N.V. Products for baby food based on meat raw materials. Tutorial. — М.: VNIIMP, — 2003, — P. 384.
13. Borovik T.E. Organization of healthy diet for children with food allergy. Materials of the VI-th All-Russian Conference «Healthy Nutrition» — М.: 2001. — P. 32–33.
14. Ladodo, K.S. Guidelines for the therapeutic nutrition of children. — М.: Medicine. — 2000, — P. 384 (18–20).
15. Rimareva, L.V. Effective enzyme preparation of proteolytic and hemicellulose action for processing areas of agro-industrial complex / L.V. Rimareva, M.B. Overchenko, E.M. Serba, K.L. Agashicheva // *Production of alcohol and alcoholic beverages.* — 2010. — № 4. — P. 14–16.
16. Serba, E.M. Effect of detergents on the secretion of intracellular enzymes from the biomass of *Aspergillus oryzae* fungus / E.M. Serba, M.B. Overchenko, L.V. Rimareva, Y.A. Borscheva // *Storage and processing of agricultural raw materials.* — 2011. — № 12. — P. 39–40.
17. Dydykin, A.S. Hypoallergenic products based on meat for young children / A.S. Dydykin, A.A. Gubina, E.I. Kurbatova // *Meat technologies* — 2015. — № 6. — P. 38–41.
18. Dydykin A.S., Gubina A.A., Kurbatova E.I. Selection of enzyme specific for bovine serum albumin in order to create hy-

18. Dydykin A.S., Gubina A.A., Kurbatova E.I. Selection of enzyme specific for bovine serum albumin in order to create hypoallergenic meat products for baby food // Collection of scientific works of VNIIPBT «Perspective enzyme preparations and biotechnological processes in food and feed technologies». — M., 2014. — P. 159–164.

19. Lisitsyn, A.B. The effect of water with reduced deuterium content on laboratory animals with different functional state of nonspecific defense systems / A.B. Lisitsyn, M.G. Baryshev, A.A. Basov, E.V. Barysheva, I.M. Bykov, A.S. Dydykin, E.E. Tekutskaya, S.S. Dzhimak, L.V. Fedulova // *Biophysics*, 2014. — Vol. 59. — № 4. — P. 757–765.

20. Fedulova L.V., Dzhimak S.S., Kotenkova E.A., Vasilevskaya E.R., Chernukha I.M. (2016). Influence of Deuterium Depleted Water on Rat Physiology: Reproductive Function, Forming and Posterity Development // *Journal of Pharmacy and Nutritional Sciences*. — № 6. — P. 55–60. DOI: <http://dx.doi.org/10.6000/1927-5951.2016.06.02.3>.

21. Vasilevskaya E.R., Kotenkova E.A., Fedulova L.V. (2016). The study of tissue-specific proteins and peptides influence on innate immunity // *J Clin Cell Immunol*. V. 7:3(Suppl). — P. 86. — <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9899.C1.028> DOI: 10.4172/2155-9899.C1.028.

poallergenic meat products for baby food // Collection of scientific works of VNIIPBT «Perspective enzyme preparations and biotechnological processes in food and feed technologies». — M., 2014. — P. 159–164.

19. Lisitsyn, A.B. The effect of water with reduced deuterium content on laboratory animals with different functional state of nonspecific defense systems / A.B. Lisitsyn, M.G. Baryshev, A.A. Basov, E.V. Barysheva, I.M. Bykov, A.S. Dydykin, E.E. Tekutskaya, S.S. Dzhimak, L.V. Fedulova // *Biophysics*, 2014. — Vol. 59. — № 4. — P. 757–765.

20. Fedulova L.V., Dzhimak S.S., Kotenkova E.A., Vasilevskaya E.R., Chernukha I.M. (2016). Influence of Deuterium Depleted Water on Rat Physiology: Reproductive Function, Forming and Posterity Development // *Journal of Pharmacy and Nutritional Sciences*. — № 6. — P. 55–60. DOI: <http://dx.doi.org/10.6000/1927-5951.2016.06.02.3>.

21. Vasilevskaya E.R., Kotenkova E.A., Fedulova L.V. (2016). The study of tissue-specific proteins and peptides influence on innate immunity // *J Clin Cell Immunol*. V. 7:3(Suppl). — P. 86. — <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9899.C1.028> DOI: 10.4172/2155-9899.C1.028.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

### Принадлежность к организации

**Дыдыкин Андрей Сергеевич** — кандидат технических наук, доцент, руководитель отдела научно-прикладных и технологических разработок. Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26  
Тел.: 8-495-676-75-41  
E-mail: [das\\_tih@mail.ru](mailto:das_tih@mail.ru)

**Минаев Михаил Юрьевич** — кандидат технических наук, руководитель ПЦР направления, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26  
Тел.: 8-495-676-60-11  
E-mail: [mminaev@inbox.ru](mailto:mminaev@inbox.ru)

**Толмачева Галина Сергеевна** — аспирант, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26  
Телефон: раб. 8-495-676-92-11  
E-mail: [vivarium@vniimp.ru](mailto:vivarium@vniimp.ru)

**Мусатова Анастасия Андреевна** — аспирант, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26  
Тел.: 8-495-676-75-41  
E-mail: [asya\\_anastasia@mail.ru](mailto:asya_anastasia@mail.ru)

### Критерии авторства

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат. Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

Все авторы в равной степени участвовали в этой работе: Дыдыкин А.С. разработал технологию изготовления модельных мясных систем; Минаев М.Ю. обосновал использование стартовой культуры *Lactobacillus plantarum* и обеспечил ее подготовку и внесение в модельные мясные системы; Толмачева Г.С. осуществляла контроль за содержанием лабораторных животных в течение всего эксперимента и произвела статистическую обработку результатов; Мусатова А.А. осуществляла технологическую выработку модельных мясных систем. Обобщение материалов и редактирование статьи в соответствии с требованиями журнала произвел Дыдыкин А.С.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.02.2017

## AUTHOR INFORMATION

### Affiliation

**Dydykin Andrei Sergeevich** — candidate of technical sciences, docent, head of the Department of Scientific Applied and Technological Developments, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute, 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel: 8-495-676-75-41  
E-mail: [das\\_tih@mail.ru](mailto:das_tih@mail.ru)

**Minaev Mikhail Yurievich** — candidate of technical sciences, head of the Molecular Diagnostic Division, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute, 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel: 8-495-676-60-11  
E-mail: [mminaev@inbox.ru](mailto:mminaev@inbox.ru)

**Tolmacheva Galina Sergeevna** — postgraduate student, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel: 8-495-676-92-11  
E-mail: [vivarium@vniimp.ru](mailto:vivarium@vniimp.ru)

**Musatova Anastasija Andreevna** — postgraduate student, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute, 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel: 8-495-676-75-41  
E-mail: [asya\\_anastasia@mail.ru](mailto:asya_anastasia@mail.ru)

### Contribution

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

All authors are responsible for the work and information provided.

All authors equally participated in this work.

Dydykin A.S. has developed the manufacturing technology of the model meat systems;

Minaev M.Y. substantiated the use of starter culture of *Lactobacillus plantarum* and provided for its preparation and introduction into model meat system;

Tolmacheva G.S. supervised the care of laboratory animals throughout the experiment and performed statistical processing of the results;

Musatova A. carried out the technological production of model meat systems;

Synthesis and editing of the article in accordance with the requirements of the journal were carried out by Dydykin A.S.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 27.02.2017

# CRITICAL CONTROL POINT IDENTIFICATION THROUGH TROPHOLOGICAL MEAT PRODUCTION CHAIN FROM FIELD TO FORK

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКИХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ПО ТРОФОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕПИ ПРОИЗВОДСТВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ ОТ ПОЛЯ ДО ПОТРЕБИТЕЛЯ

Borodin A.V.,<sup>1</sup> Chernukha I.M.,<sup>2</sup> Nikitina M.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA by K.I. Skryabin, Moscow, Russia

<sup>2</sup> The V. M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute, Moscow, Russia

**Ключевые слова:** трофологическая цепь, критические контрольные точки, система HACCP, мясные продукты.

**Keywords:** trophological chain, critical control points, HACCP, meat products.

### Аннотация

Управление конкурентоспособным производством невозможно без комплексного мониторинга опасностей и управления критическими параметрами на каждом этапе производства пищевого продукта от момента поступления на предприятие сырья и материалов до передачи готового продукта на реализацию, что затруднительно без современной IT-поддержки процессов. Подход HACCP (НАССР — анализ опасностей и критические контрольные точки) для обеспечения безопасности продукта отличен от испытаний готового продукта на соответствие требованиям НТД, и подчеркивает важность процессного подхода к мониторингу на каждом этапе производства пищевого продукта. Выявление критических контрольных точек (Critical Control Points (ККТ) — это этап работы, где признается присутствие риска производства небезопасного для здоровья человека продукта, и возможно принятие мер по его устранению, предупреждению или сокращению до приемлемого уровня. Эффективность системы HACCP предприятия значительно повышается при использовании программного комплекса. В статье изложены методологические основы решения задачи по разработке IT подхода к идентификации критических контрольных точек в трофологической цепи производства мясных продуктов от поля до потребителя. Разработано алгоритмическое и программное обеспечение численной реализации «Дерева принятия решений» для каждого этапа, позволяющее выявить существующие опасности, идентифицировать риски, установить ККТ и охарактеризовать их.

### Abstract

Competitive production management is impossible without comprehensive hazard monitoring and critical parameters control at every stage of food production from raw material and auxiliary materials delivery to ready product realization, which is difficult without modern IT-support. The HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) approach to product safety differs from ready product testing for compliance with NaTD requirements (Normative and Technical Documentation) and emphasizes the importance of the process approach to monitoring at every stage of food production. Critical control points (CCP) identification is a stage, where the presence of a risk of manufacturing products that are unsafe for human health is recognized and it is possible to take action to its elimination, prevention or reduction to an acceptable level. The use of software package significantly increases the enterprise HACCP system efficiency. The article describes methodological bases for IT-approach to the CCP identification in the trophological meat production chain from field to fork. The algorithmic support and software for the «Decision tree», which allows detecting existing hazards, identifying risks, determining CCPs and describing them, has been developed.

### Введение

Традиционные схемы подтверждения качества и безопасности продукции базируются на оценке отдельных показателей, подлежащих контролю. В основном, это осуществляется на этапе выхода готового продукта с предприятия в реализацию. В этом случае представляется затруднительным еще на стадии проектирования производства прогнозировать вероятные отклонения показателей безопасности продукции и реализовать адекватные предупреждающие мероприятия, которые в дальнейшем могут сократить затраты на ее доработку и переработку, либо утилизации — в случае отрицательных результатов при ис-

### Introduction

The traditional schemes of product quality and safety confirmation are based on the evaluation of selected indicators, which are subjected to control. Basically, it is carried out at the stage of ready product output from an enterprise. In this case, it is difficult to predict, as early as at the stage of manufacturing design, the probable deviations of product safety indicators and implement adequate preventive measures, which potentially can reduce costs for product's rework, or utilization — in case of negative test results. The

пытаниях. Преимущество системы ХАССП состоит в возможности применения ее принципов на всех этапах технологической цепи [1–5].

В настоящее время системы ХАССП (НАССР — Hazard Analysis Critical Control Point) применяют во всем цивилизованном мире как надежную защиту потребителей от возможных опасностей.

Концепция ХАССП была разработана в США в 1973 г., Европейский Союз впервые воспользовался ей только в 1990 г. в рамках исследовательского проекта, в России же только в 2001 г. были введены принципы ХАССП как инструмента управления безопасностью производства пищевого продукта. Однако до июля 2013 года внедрение системного управления качеством на основе принципов ХАССП оставалось добровольным для российских пищевых предприятий.

Согласно концепции ХАССП [6], разработка системы должна включать три стадии (этапа):

- оценку гигиенической опасности (Hazard), связанную с определенным пищевым продуктом и определение риска;
- определение критических контрольных точек (ККТ), в которых может проявиться недопустимый риск;
- выявление и отслеживание контрольных параметров, с помощью которых можно предотвратить или свести до приемлемых параметров имеющиеся опасности.

Для обоснования контрольных точек система управления безопасностью пищевых продуктов базируется на следующих принципах:

- анализ опасных факторов и идентификация рисков на всех этапах производства;
- определение критических контрольных точек (ККТ);
- установление критических пределов для каждой ККТ — определение критерия, который свидетельствует о том, что процесс находится под контролем;
- установление порядка выполнения мониторинга ККТ;
- разработка корректирующих действий в том случае, если процесс выходит из-под контроля;
- учет и внедрение документации;
- проверка жизнеспособности системы.

Применительно к мясным продуктам весьма актуальной является задача имитационного моделирования взаимодействия характеристик, как средство диагностики и прогнозирования конечного качества и безопасности продукта. Решение этой задачи позволит реализовать оперативное управление процессами производства и оптимизацию технологических параметров в режиме реального времени.

Цель работы заключается в определении методологических подходов для разработки алгоритмического и программного обеспечения численной реализации «Дерева принятия решений» для каждого этапа трофологической цепи, позволяющего выявить опасные

advantage of HACCP system lies in the possibility of using its principles at all stages of meat production chain [1–5].

At the present time, the HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) systems are used throughout the civilized world as reliable protection of consumers against possible hazards.

The HACCP concept was developed in the USA in 1973, European Union used it for the first time only in 1990 in the framework of research projects, and, in Russia, the HACCP principles were introduced only in 2001 as a tool for food manufacturing safety control. However, the introduction of quality system control, which is based on the HACCP principles, was voluntary for Russian food enterprises until July 2013.

According to the HACCP concept [6], the design of the system must include three stages:

- hygienic hazard evaluation, which is related to a certain food product, and risk assessment;
- determination of critical control points (CCP), where unacceptable risk can appear;
- identification and monitoring of control parameters, by which it is possible to prevent or reduce existing hazards to acceptable parameters.

For the justification of control points, a food product safety control system is based on the following principles:

- analysis of hazardous factors and identification of risks at every production stage;
- identification of critical control points (CCPs);
- establishment of critical limits for every CCP –determination of a criterion which indicates that the process is under control;
- establishment of a CCP monitoring order;
- establishment of corrective actions in case if the process goes out of control;
- establishment of recordkeeping and documentation procedures;
- establishment of system verification.

In the context of meat products, the task of imitation modeling (simulation) of characteristics interactions is quite topical as a tool for diagnostic and prediction of product final quality and safety. The solution to this problem will allow implementing operational control of manufacturing processes and optimization of technological parameters in real time.

The purpose of the work lies in determination of methodological approaches for development of algorithmic support and software for the «Decision tree» for every stage of the trophological chain, which allows identi-

факторы, оценить риски и установить ККТ на примере переработки мясного сырья и производства мясной продукции. При этом, под трофологической цепью мы понимаем (греч. trophia — питание, logia — наука) научно-обоснованную последовательность этапов производства и потребления пищевых продуктов, оказывающих алиментарное воздействие на организм человека.

Разработанный IT-пакет предназначен для максимальной автоматизации процесса мониторинга и контроля показателей безопасности и качества на каждой стадии выработки пищевого продукта.

### Материалы и методы

В соответствии с принципами HACCP под ККТ понимается точка, операция или процесс, в котором присутствует риск производства продукции, опасной для здоровья человека, и где может быть использовано управляющее воздействие, достаточное для предотвращения риска или его снижения до приемлемого уровня [7–12].

Предлагаемая методика объединяет три стадии (этапа) в единый процесс компьютерного анализа и предполагает формирование системы ККТ с использованием производственных правил и кластерного анализа обрабатываемых информационных массивов, представленных в виде матричных моделей.

Для установления ККТ и критических пределов:

- проведение системного анализа трофологической цепи мясных продуктов от поля до потребителя;
- сбор и обобщение всех существенных факторов, появление которых возможно на технологических операциях;
- путем экспертных оценок выявление контролируемых факторов;
- построение параметрических моделей технологических операций;
- определение критических контрольных точек в соответствии с основными принципами HACCP и с использованием «Дерева принятия решений».

### Результаты

Концепция интегрированного контроля требует открытой коммуникации и применения соответствующих информационных технологий. Все участвующие в производстве (от производителей кормов до продавцов) должны вести соответствующие записи о деятельности, и соответствующие данные должны предоставляться властям. Только таким образом можно добиться возможности обратного прослеживания того или иного продукта. Возможность такого прослеживания является важной частью концепции интегрированного контроля. Она требует контроля за кормлением животных, идентификации животных и средств их перевозки, ведения записей о применении антибиотиков и другом лечении животных, четкого маркирова-

nying hazardous factors, evaluating risks and determining CCPs by the example of meat raw processing and meat production. Herewith, we understand by the trophological chain (Gr. trophia — food, logia — science) a science-based sequence of stages of food manufacturing and consumption, which has an alimentary impact on the human organism.

The designed IT-package is intended for maximum automation of the process of monitoring and controlling safety and quality indicators at every stage of food production.

### Materials and methods

According to the HACCP principles, a CCP is a point, an operation or a process, where there is a risk of manufacturing products, which are hazardous for human health, and where control action, which is sufficient for risk prevention or reduction to an acceptable level, can be used [7–12].

The proposed methods combine three stages into a single process of computer analysis and imply CCP system formation with using production rules and cluster analysis of processed information arrays, which are represented as matrix models.

For determination of CCP and critical limits:

- the system analysis of meat product trophological chain from field to fork is performed;
- all essential factors, which are possible in technological operations, are collected and generalized;
- controlled factors are identified by expert assessments;
- parametric models of technological operations are constructed;
- CCPs are determined in accordance with the basic HACCP principles and using the «Decision tree».

### Results

The integrated control conception requires open communication and application of appropriate information technologies. All those involved in manufacturing (from forage manufacturers to sellers) must keep appropriate records, and appropriate information must be provided to the authorities. It is the only way to get the possibility of traceback for one or the other product. This possibility is an important part of the integrated control conception. It requires control of animal feeding, animal identification and transportation means, keeping records about using antibiotics and other animal treatment, precise labeling of

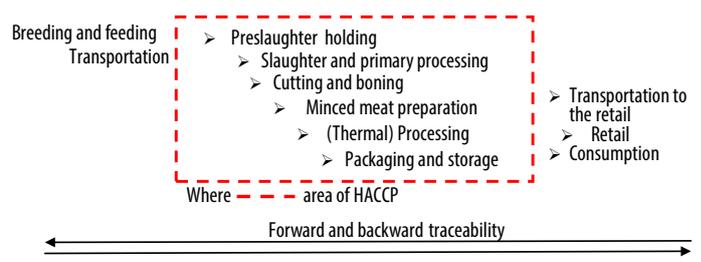
ния каждой партии животной продукции и указания всех пищевых элементов при продаже [11].

Мясная промышленность занимает промежуточное положение между потребителями и сельским хозяйством. Ее задача — всестороннее изучение потребностей населения и предъявление на этой основе заказа на производство сырья необходимого качества. В результате проведения системного анализа были выявлены основные звенья (операции) трофологической цепи мясных продуктов от поля до потребителя:



every installment of animal products and direction of all food elements when selling [11].

The meat industry occupies an intermediate position between consumers and agriculture. Its task is comprehensive study of population's needs and, on this basis, submitting an order for manufacturing raw material with necessary quality. The result of the system analysis was identification of the basic stages (operations) in the trophological meat production chain from field to fork:



Прослеживаемость должна быть обеспечена за счет постоянного сбора и анализа информации о состоянии сырья и готовой продукции, что возможно при внедрении Единой информационно-аналитической компьютерной системы для выявления потенциально опасных или вредных условий производства и оборота сырья и пищевой продукции; мониторинга состава и качества сырья по сырьевым зонам, а также продукции на всех этапах ее производства, вплоть до реализации ее потребителю и др. (рис. 1).

Traceability must be provided by continuous collection and analysis of information about the condition of raw material and ready products, which is possible with the Single information-analytical computer system for identification of potentially hazardous or harmful conditions of manufacture and turnover of raw material and food products; monitoring of raw material composition and quality according to raw material zones, as well as products at all manufacture stages up to a consumer, etc. (Figure 1).

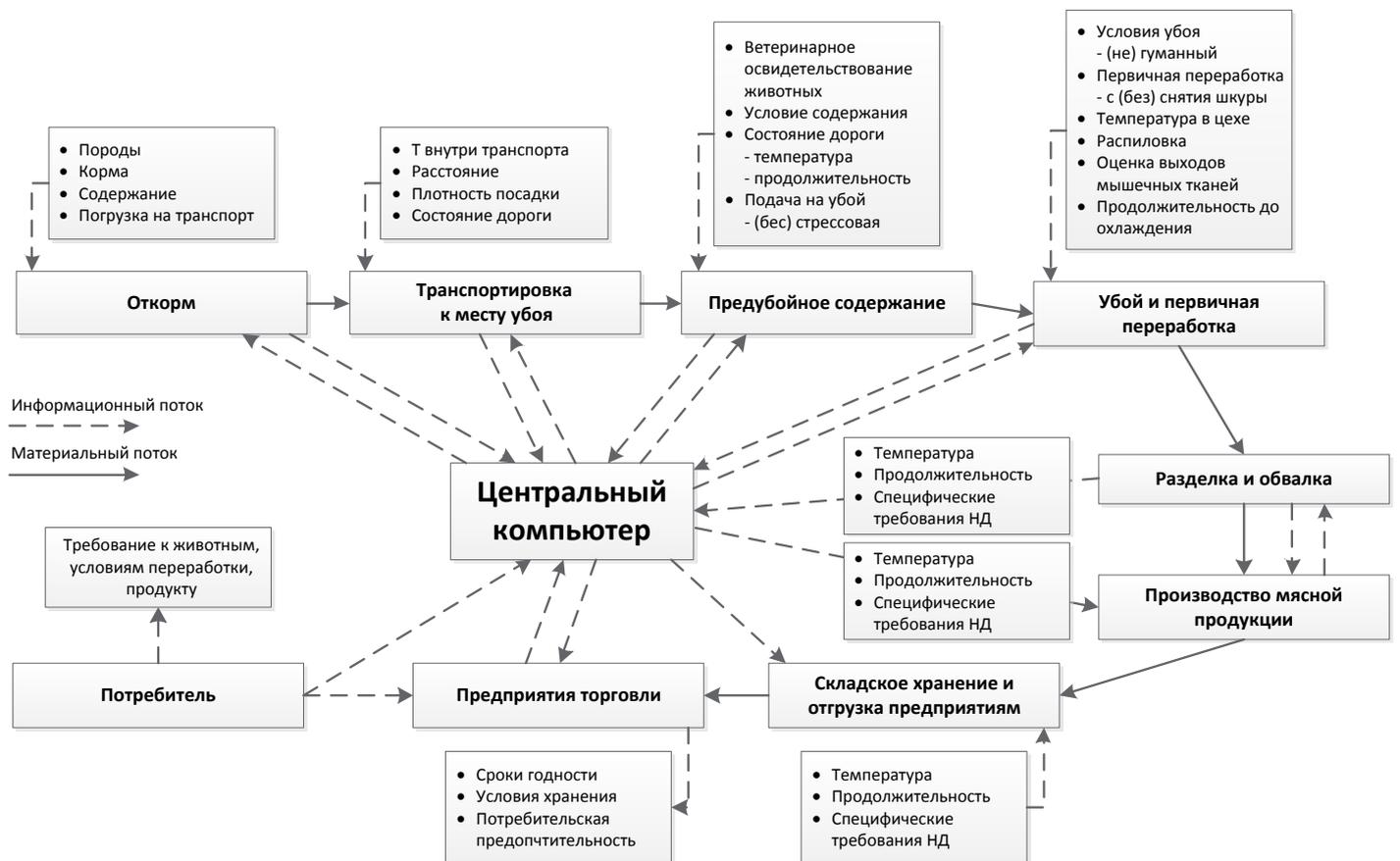


Рис. 1. Схема прослеживаемости по трофологической цепи производства мясных продуктов от поля до потребителя

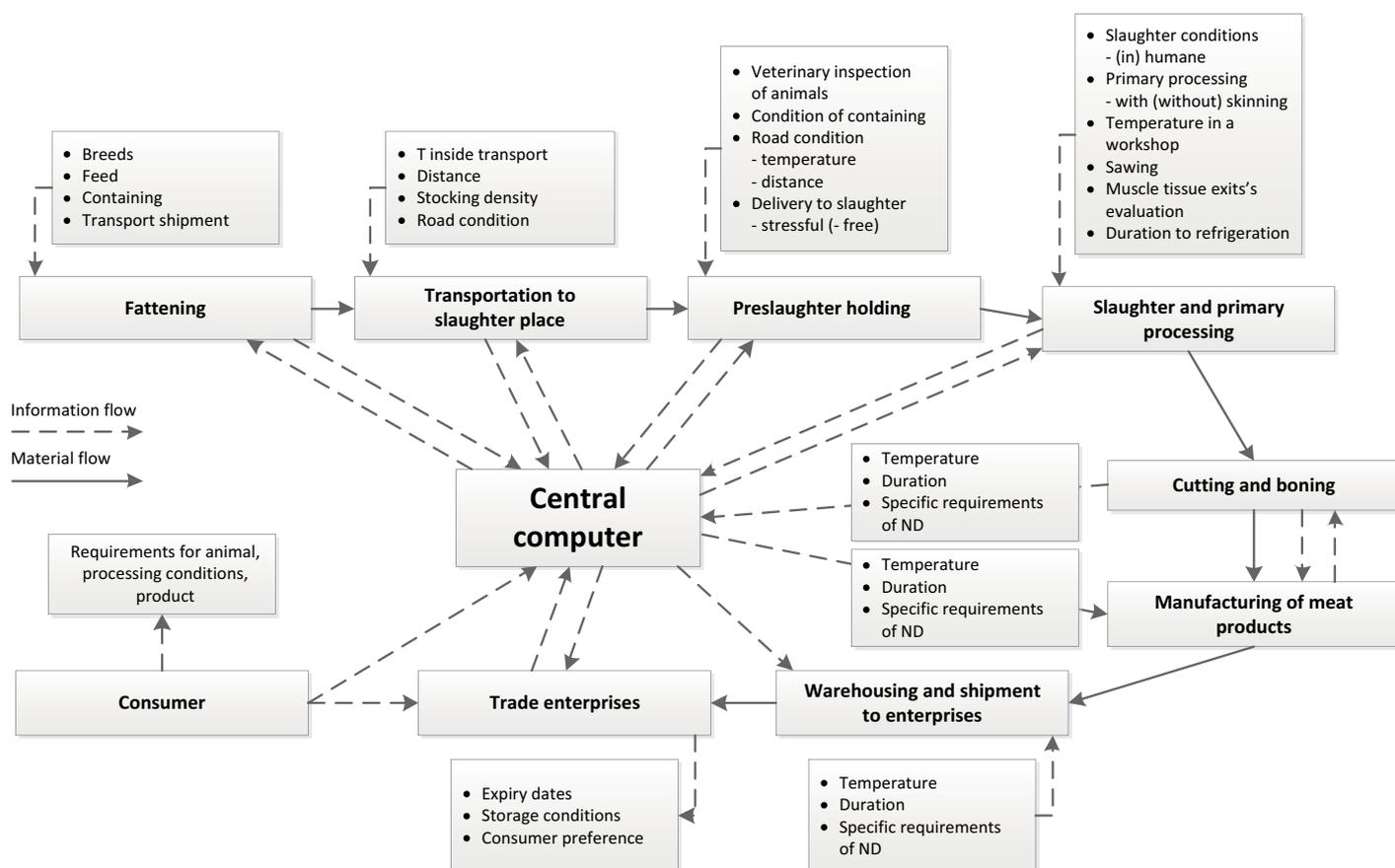


Figure 1. The scheme of traceability for the trophological meat production chain from field to fork

Анализ опасных факторов производства мясных продуктов показал, что 69 % опасных факторов, относящихся к недопустимому риску, — это биологические факторы, 21,6 % — физические факторы и 9,4 % — химические [13, 14]. На основании обнаруженных недопустимых рисков выявлены общие ККТ для трофологической цепи. Анализ подвергались последовательно все стадии производственного процесса, с учетом рисков, относящихся к категории недопустимых — зона высокого и среднего риска. При этом учитывалось влияние последующих стадий производственного процесса на вероятность реализации рисков.

В число общих ККТ входят откорм, съемка шкуры, разделка и обвалка, контроль активного начала в готовом продукте, хранение в местах реализации и хранение у потребителя.

После декомпозиции технологического процесса до уровня технологических операций следует формирование параметрической модели технологического процесса, в которой учитывается последовательность технологических операций; совокупность параметров, с помощью которых обеспечивается прослеживаемость, контролируемость и управляемость, как отдельной операции, так и всего процесса в целом; диапазоны значений каждого из параметров, контролируемого объекта и т.д. [15–17].

В случае применения HACCP к конкретной технологической операции следует обращать внимание на предшествующий и последующий ей этапы.

The analysis of hazardous meat production factors showed that 69% of hazardous factors, which present an unacceptable risk, are biological factors, 21.6% are physical factors and 9.4% are chemical factors [13, 14]. Based on the discovered unacceptable risks, common CCPs for the trophological chain were identified. All manufacture process stages were analyzed successively taking into account risks, which fell in the unacceptable category — the zone of the high and medium risk. Herewith, the influence of the following manufacture process stages on the probability of risk realization was taken into account.

The common CCPs include fattening, skinning, cutting and boning, control of an active substance in a ready product, storage in points of sale and at a consumer's location.

After technological process decomposition to the level of technological operations the parameter model of the technological process is formed. It takes into account the sequence of technological operations; the set of parameters, by means of which traceability and controllability of both a particular operation and the whole process are provided; the ranges of values of every parameter, controlled object etc. [15–17].

In the case of applying HACCP to a specific technological operation it is necessary to pay attention to previous and next stages.

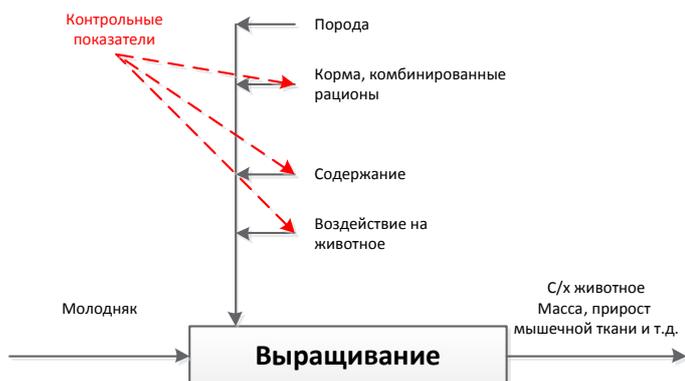


Рис. 2. Параметрическая модель «Выращивание»

Анализ литературных источников [11, 13, 18, 19] позволяет сделать вывод, что звено **ВЫРАЩИВАНИЕ**, несомненно является первым по значимости определяющим фактором воздействия на состав и свойства готового продукта.

Для звена **ВЫРАЩИВАНИЕ** определяющие параметры — это порода, состав комового рациона, условия содержания животного, наличие внешнего воздействия на животное (рис. 2).

Цель звена **ВЫРАЩИВАНИЕ** зависит от задачи процесса. Для зоотехника — это снижение заболеваемости, ускорение роста, увеличение массы тела, снижение падежа, увеличение приплода (для свиноматок). Для технолога выходными параметрами процесса «Выращивание» станут снижение стресса и падежа при транспортировке и предубойном содержании; повышение доли мышечной ткани на туше; достижение оптимального содержания и распределения жира; получение сырья с заданными функционально-технологическими характеристиками; направленном изменении нутриентного состава; формировании биокорректирующих свойств мясного сырья [11].

Аналогичные параметрические модели были построены и для всех остальных звеньев трофологической цепи с позиции процессного подхода (табл. 1).

Мнение экспертов поможет сузить исходную таблицу до контролируемых опасных факторов, появление которых, как предполагается, можно ожидать на каждом этапе от выращивания до конечного потребления. Анализ выявленных факторов позволяет отобрать те из них, устранение или снижение действия, которых, до допустимого уровня, существенно влияет на выпуск безопасного продукта

Далее, в соответствии с общими принципами ХАССП и используя «Дерево принятия решений», определяются критические контрольные точки трофологической цепи производства мясных продуктов от поля до потребителя. При их определении использовалась разработанная компьютерная программа, реализующая «Дерево принятия решений».

В режиме диалога выбирается требуемая операция, для этой операции выбирается оцениваемый опасный фактор и далее требуется ответить на вопросы «Дерева

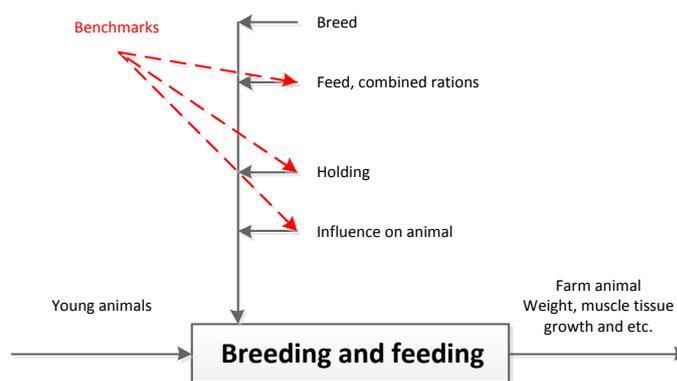


Figure 2. Parameter model «Breeding and feeding»

The analysis of literary sources [11, 13, 18, 19] allows making a conclusion that the stage **BREEDING AND FEEDING** is certainly the primary factor determining an effect on the composition and the properties of a finished product.

The key parameters for the stage **BREEDING AND FEEDING** are a breed, feed ration composition, conditions of animal keeping, and the presence of an external influence on an animal (Figure 2).

The purpose of the stage **BREEDING AND FEEDING** depends on a process task. For a zootechnician, it is morbidity reduction, growth acceleration, body mass increase, mortality reduction, offspring increase (for sows). For a technologist, the output parameters of the process **BREEDING AND FEEDING** are reduction of stress and mortality during transportation and preslaughter holding; an increase in the muscle tissue proportion in a carcass; achievement of the optimal fat content and distribution; production of raw material with specified functional and technological characteristics; targeted change of the nutrient composition; formation of biocorrective properties of meat raw material [11].

The similar parametric models were also constructed for all other trophological chain stages from the position of a process approach (Table 1).

An expert opinion will help to narrow the initial table to controllable hazardous factors, which supposedly can be expected at every stage from field to fork. The analysis of the identified factors allows selecting those, elimination or reduction of which to an acceptable level significantly influences production of a safe product.

Further, according to the HACCP general principles and by using the «Decision tree», critical control points of the trophological meat production chain from field to fork are determined. For their determination, the designed computer program, which realizes the «Decision tree», was used.

A required operation is selected in the dialogue mode. An evaluated hazardous factor is selected for this operation, and, further, it is necessary to answer the questions

Table 1 | Таблица 1

Input   Вход	Control (controllable/uncontrollable parameters)   Управление (контролируемые/неконтролируемые параметры)	Output   Выход
<b>BREEDING AND FEEDING   ВЫРАЩИВАНИЕ</b>		
Young animals   Молодняк	Feed, combined rations;   Корма, комбинированные рационы; Stock keeping;   Содержание; Influence on an animal;   Воздействие на животное; Breed.   Порода.	Farm animal   С/х животное Weight, muscle tissue gain etc.   Масса, прирост мышечной ткани и т.д.
<b>TRANSPORTATION, PRESLAUGHTER HOLDING   ТРАНСПОРТИРОВКА, ПРЕДУБОЙНОЕ СОДЕРЖАНИЕ</b>		
Farm animal   С/х животное	Conditions, regimes and methods of transportation;   Условия, режимы и способы транспортировки Infection from a sick animal;   Заражение от больного животного; Transfer of chemical substances (For example: from the walls of the vehicle body, through feed);   Попадание химических веществ (например: от стенок транспортного средства, через корм); Insufficient time of fasting, stock density, distance and time of transportation   Недостаточное время голодания, плотность посадки, длительность и время транспортировки	Ready for slaughter farm animal   С/х животное, готовое к убою
<b>SLAUGHTER AND PRIMARY PROCESSING   УБОЙ И ПЕРВИЧНАЯ ПЕРЕРАБОТКА</b>		
Ready for slaughter farm animal   С/х животное, готовое к убою	Transfer of microorganisms with water;   Попадание микроорганизмов с водой; Contamination of carcasses with microorganisms when skinning and evisceration;   Контаминация микроорганизмами туш при шкурорезке и нутровке Appropriate bleeding;   Полнота обескровливания; Disinfectants, lubricant oils from equipment and inventory;   Дезинфицирующие средства, смазочные масла от оборудования и инвентаря; «Fortificants» (vitamins, minerals and etc.);   «Обогащители» (витамины, минеральные вещества и пр.); Transfer of shards from inventory or remains of bone tissue to meat;   Попадание в мясо сколов с инвентаря или остатков костной ткани; Noncompliance with temperature and humidity regimes, consequently, the growth of microorganisms.   Несоблюдение температурных и влажностных режимов, как следствие рост микроорганизмов.	Carcass   Туша Meat cuts, meat, byproducts   Отрубы, мясо, субпродукты
<b>CUTTING   РАЗДЕЛКА</b>		
Carcass, meat cuts, meat   Туша, Отрубы, мясо	Environment parameters:   Параметры окружающей среды: — temperature;   температура; — humidity.   влажность.	Ready for processing raw   Сырье, готовое к переработке, обработке
<b>MINCED MEAT PREPARATION   ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФАРША</b>		
Raw material   Сырье	Environment parameters:   Параметры окружающей среды: — temperature;   температура; — humidity.   влажность. Minced meat temperature;   Температура фарша; Order of ingredient adding;   Порядок закладки ингредиентов; Noncompliance with temperature and humidity regimes;   Несоблюдение температурных и влажностных режимов; Overdose of nitrites and phosphates;   Передозировка нитритов и фосфатов; Contamination with washing disinfectants;   Попадание моющих дезинфицирующих средств; Lubricant oils;   Попадание смазочных масел; Transfer of foreign particles to products;   Попадание посторонних предметов в продукцию; Noncompliance with the rule «first in — first out»;   Несоблюдение правила «первый вошел — первый вышел»; Cross-contamination of products by staff.   Кроссконтаминация продукции от персонала.	Minced meat   Фарш
<b>HEAT TREATMENT AND REFRIGERATION   ТЕРМИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА И ОХЛАЖДЕНИЕ</b>		
Minced meat   Фарш	Noncompliance with temperature and humidity regimes, consequently, growth of microorganisms;   Несоблюдение температурных и влажностных режимов, как следствие рост микроорганизмов; Formation of toxic compounds (PAH, HCA etc.) during smoking process.   Образование токсичных соединений (ПАУ, ГЦА и др.) при копчении.	Ready for packing products   Продукция готовая к упаковке
<b>PACKING, LABELING AND KEEPING   УПАКОВКА, МАРКИРОВКА И ХРАНЕНИЕ</b>		
Ready for packing products   Продукция готовая к упаковке	The growth of microorganisms when a package is broken;   Рост микроорганизмов при нарушении герметичности упаковки. Noncompliance with temperature and humidity regimes;   Несоблюдение температурных и влажностных режимов; Transfer of foreign particles to a ready product;   Попадание посторонних предметов в готовый продукт; Noncompliance with the rule «first in — first out»;   Несоблюдение правила «первый вошел — первый вышел»; Cross-contamination of products by staff.   Кроссконтаминация продукции от персонала.	Ready product   Готовый продукт
<b>RETAIL   ТОРГОВЛЯ</b>		
Ready product   Готовый продукт	<i>The growth of microorganisms when a package is broken;   Рост микроорганизмов при нарушении герметичности упаковки; Noncompliance with temperature and humidity regimes, consequently, the growth of microorganisms;   Несоблюдение температурных и влажностных режимов, как следствие рост микроорганизмов; Noncompliance with expiry dates.   Несоблюдение сроков годности</i>	Completely safe meat product throughout expiry date   Полностью безопасный мясной продукт в течение всего срока годности
<b>CONSUMER   ПОТРЕБИТЕЛЬ</b>		
Product   Товар	<i>The growth of microorganisms when a package is broken;   Рост микроорганизмов при нарушении герметичности упаковки. Transfer of foreign particles to a ready product;   Попадание посторонних предметов в готовый продукт; Noncompliance with cooking rules (HCA, Maillard reaction products etc.).   Нарушение правил приготовления блюда (ГЦА, продукты реакции Майяра и пр.).</i>	Consumer's health   Здоровье потребителя

принятия решений». В соответствии с вариантом ответов осуществляется автоматическое определение наличие или отсутствия критической контрольной точки.

На приведенных рисунках 3–6 представлены экранные формы диалога.

«Начать работу» — при нажатии на эту кнопку начинается работа с системой и открывается следующая экранная форма (рис. 4), в котором представлена технологическая схема производства с указанием и описанием опасных факторов. При возвращении в главное меню кнопка меняется на «Продолжить работу».

При переходе к экранной форме (рис. 4) в режиме диалога выбирается требуемая операция, для этой операции выбирается оцениваемый опасный фактор, выбирается пункт «Определение ККТ».

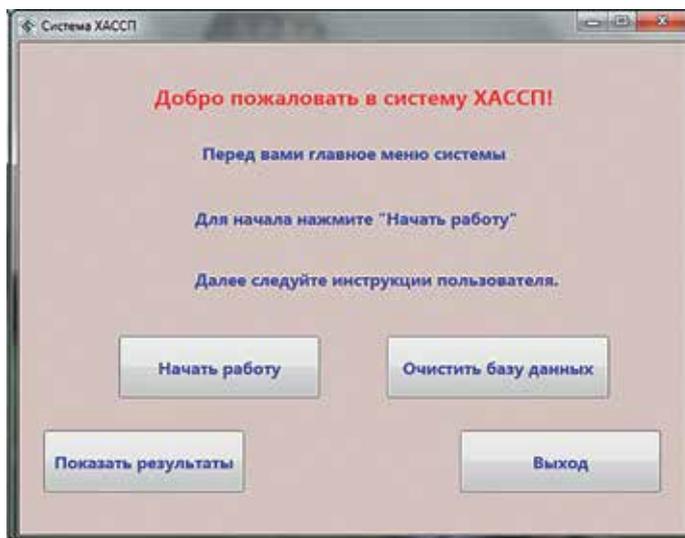


Рис. 3. Головное меню программы

of the «Decision tree». According to an option of answers, the presence or absence of a critical control point is determined automatically.

The dialogue screen forms are presented on the Figures 3-6.

«Start work» — pressing this button starts work with the system and opens the next screen form (Figure 4), which presents the manufacture technological scheme with the designation and description of hazardous factors. When returning to the main menu the button changes on «Continue work».

When getting to the screen form (Figure 4), a required operation is selected in the dialogue mode, an evaluated hazardous factor is selected for this operation, the item «CCP determination» is selected.



Figure 3. The program main menu

Анализ опасных факторов по всей трофоэкологической цепи

Стадия производственного процесса	Тип опасного фактора	Описание (или причины возникновения) опасного фактора	Тяжесть последствий			Вероятность реализации
			Охлажденный п/ф	Замороженный п/ф	Промышленная переработка	
Транспортировка, Выращивание	предубойное	содержание, убой	убой			
	E	Порода	1	1	1	3
	X	Наличие пестицидов, солей, кадмия, гормонов, антибиотиков	3	3	2	2
	Ф	Специфические свойства	2	2	2	2
	Ф	Переломы, ушибы	1	1	1	4
Транспортировка	E	Заражение от большого животного	2	2	2	2
	X	Попадание химических веществ (например: от стенок транспортного средства, через корм)	3	3	2	3
	Ф	Недостаточное время голодания, плотность посадки, длительность и время транспортировки	2	1	1	3
Убой и первичная переработка	E	Несоблюдение температурных влажностных режимов, как следствие рост микроорганизмов	3	3	3	3
		Попадание микроорганизмов с водой	3	3	3	2
		Кроссконтаминация микроорганизмов от персонала при	3	2	3	2

Рис. 4. Технологическая схема производства

Analysis of hazard factors in all trophological chain

Stage of manufacture process	Type of hazard factor	Description (or reasons of emergence) of hazard factor	Severity of consequences			Realization probability
			Refrigerated h/s	Frozen h/s	Industry processing	
Transportation	preslaughter	containing, slaughter	slaughter			
Breeding and feeding	B	Breed	1	1	1	3
	C	Presence of pesticides, salts, cadmium, hormones, antibiotics	3	3	2	2
	P	Specific properties	2	2	2	2
Transportation	P	Fractures, bruises	1	1	1	4
	B	Infection from sick	2	2	2	2
	C	Transfer of chemical substances (for example: from the walls of the vehicle body, through feed)	3	3	2	3
Slaughter and primary processing	P	Insufficient time of fasting, stock density, distance and time of transportation	2	1	1	3
	B	Noncompliance with temperature and humidity modes, consequently growth of microorganisms	3	3	3	3
	B	Getting of microorganisms by water	3	3	3	2
		Cross-contamination of microorganisms from staff	3	2	3	2

Figure 4. Manufacture technological scheme

После перехода к экранной форме (рис. 5) происходит идентификация контрольных точек. Для каждого риска, включенного в таблицу, нужно ответить на четыре вопроса:

- существуют ли меры предосторожности для рассматриваемого вида риска?;
- действительно ли данный этап производственного процесса разработан с учетом снижения или полного устранения рассматриваемого вида риска?;
- может ли дополнительная контаминация на этом этапе процесса увеличить риск до неприемлемого уровня?;
- существует ли далее по цепочке этап производственного процесса, где снижается или полностью устраняется рассматриваемый вид риска?

Программа предоставляет пользователю возможность, отвечая на вопросы «да» и «нет», установить, является ли параметр критической контрольной точкой или контрольной точкой. При установлении итогового результата данные сохраняются в модели производства.

В соответствии с вариантом ответов осуществляется автоматическое определение наличие (рис. 6 а) или отсутствия критической контрольной точки (рис. 6 б).

В результате, базируясь на данных таблицы 1, определено 6 ККТ, из которых 3 — непосредственно связаны с производством: этап первичной переработки, фаршесоставление и термообработка/охлаждение, что согласуется с научно-обоснованными [20] ККТ — контроль целостности кишечника при нутровке и термическая обработка.

After getting to the screen form (Figure 5), control points are identified. It is necessary to answer four questions for every risk, which is included in the table:

- do precautions for a considered type of risk exist?;
- is a given stage of the manufacture process really designed with taking into account reduction or complete elimination of a considered type of risk?;
- can additional contamination at this stage of a process increase the risk to an unacceptable level?;
- does a stage of manufacture process, where the considered type of risk is reduced or completely eliminated, exist further along the chain?

The program provides a user with a possibility to determine whether a parameter is a critical control point or a control point, when answering the questions «yes» and «no». Data is saved in a production model after determination of the final result.

According to the option of answers, the presence (Figure 6 a) or absence (Figure 6 b) of a critical control point is determined automatically.

As a result, based on the data of Table 1, 6 CCPs were determined. Three of them were directly related with manufacture: primary processing stage, minced meat preparation and heat treatment/refrigeration. It is consistent with scientifically based [20] CCPs — intestinal integrity control at evisceration and heat treatment.

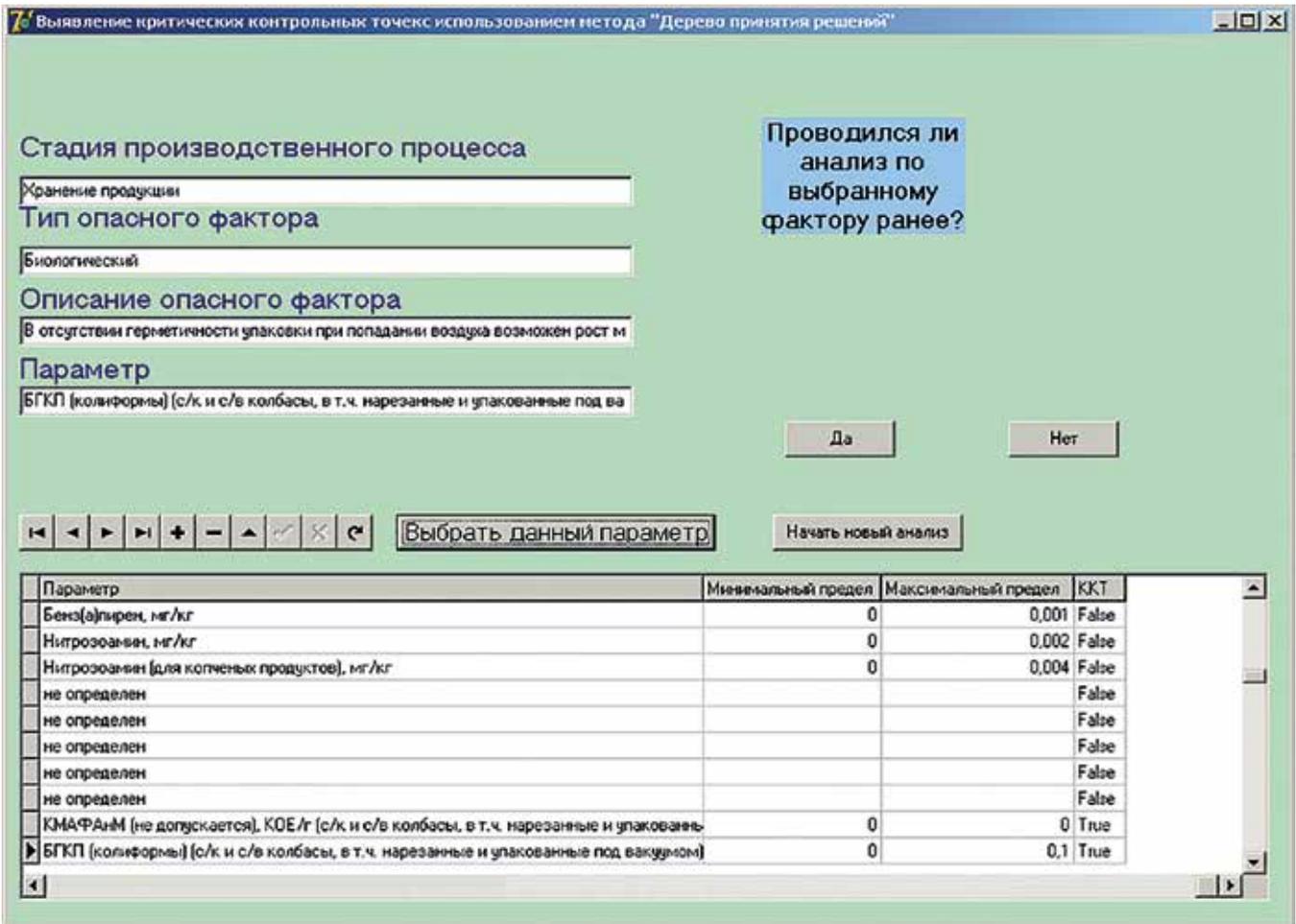


Рис. 5. Интерфейс дочерней формы проекта «Определение ККТ»

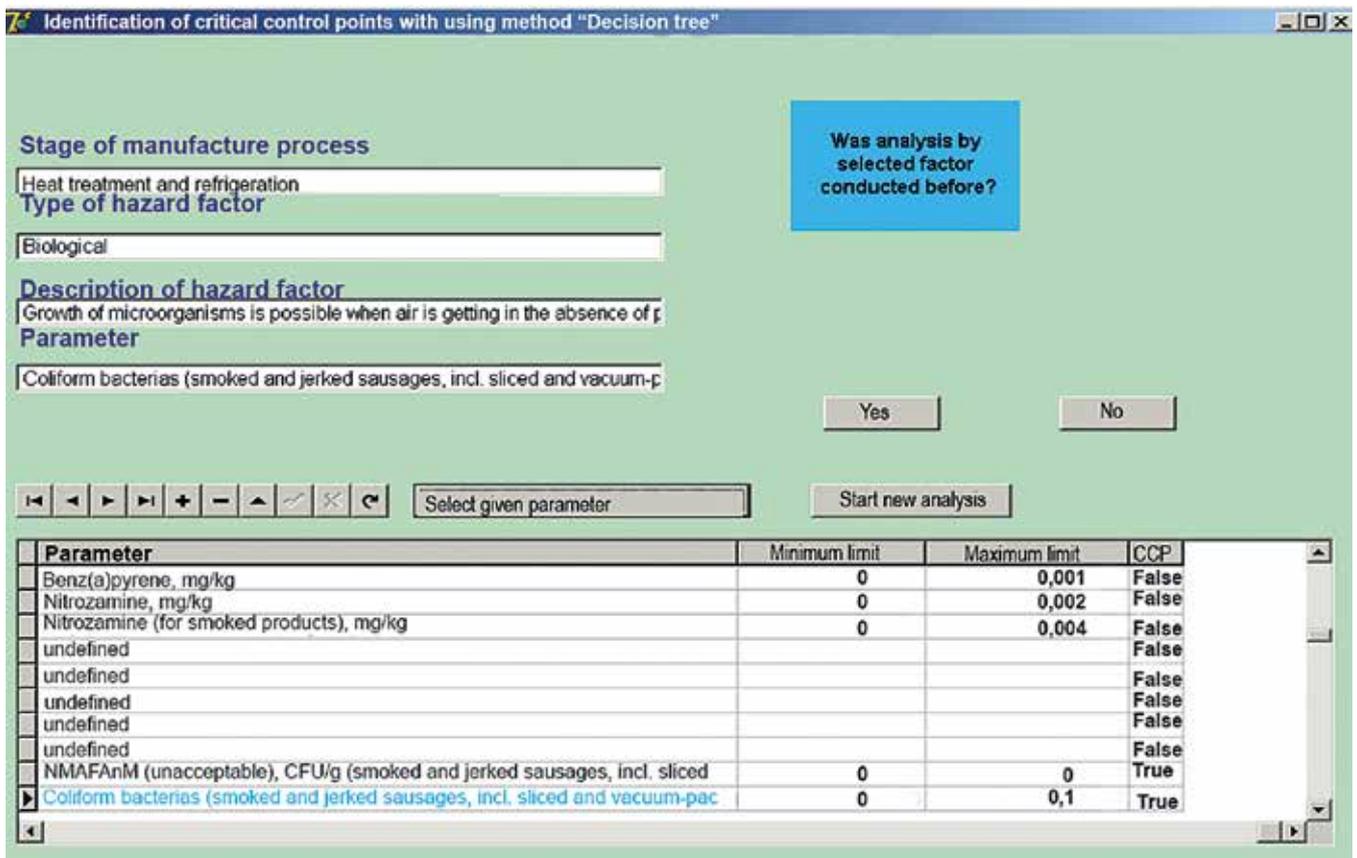
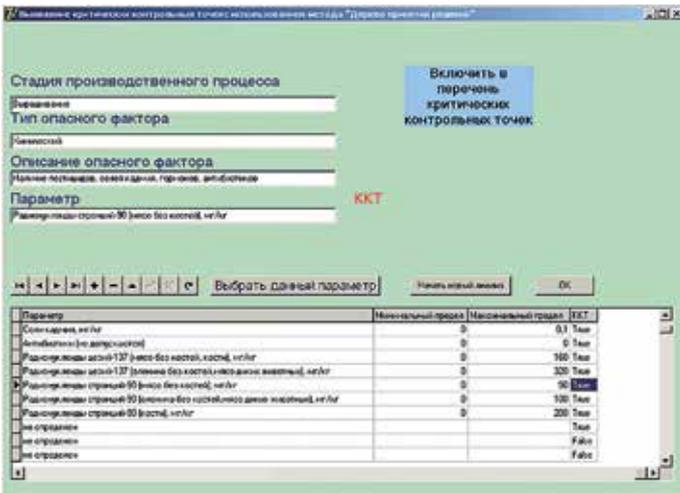
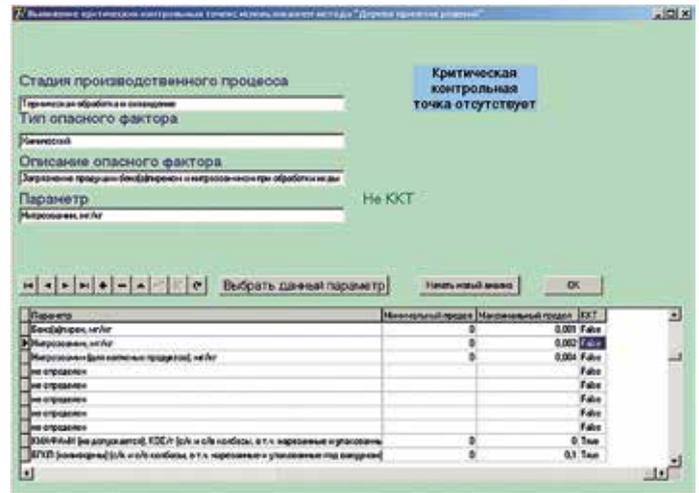


Figure 5. The interface of the subsidiary form of the project «CCP determination»

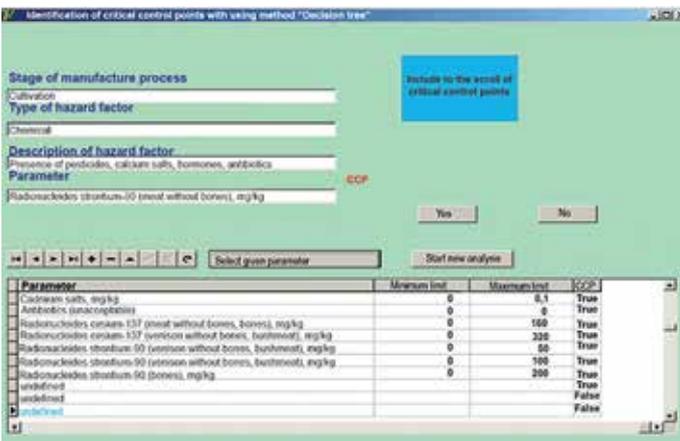


а) Выбранный фактор является ККТ

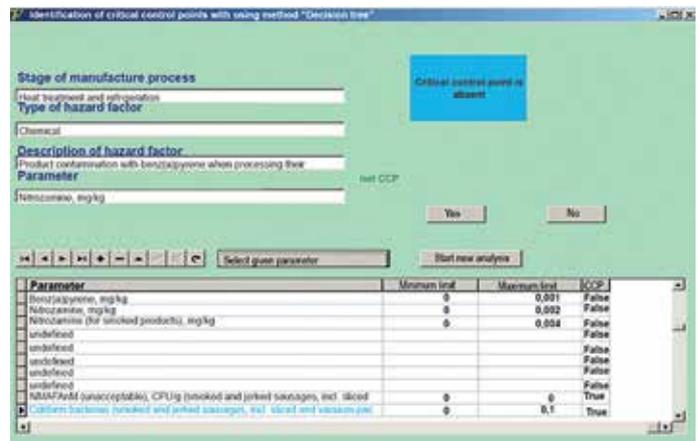


б) Выбранный фактор не является ККТ

Рис. 6. Интерфейс «Выявления ККТ с использованием процедуры Дерева принятия решений»



а) Selected factor is a CCP



б) Selected factor is not a CCP

Figure 6. Interface «Identification of CCP using procedure of Decision tree»

Далее для каждой критической контрольной точки необходимо установить критический предел — величину, отделяющую допустимый уровень от недопустимого. Критические пределы устанавливаются рабочей группой ХАССП для каждой ККТ по одному или нескольким параметрам. Источниками информации при этом служат публикуемые научные данные, результаты экспериментов, нормативные документы, рекомендации экспертов, математические модели и др. Критические пределы должны быть конкретизированы и подтверждены. Подтверждение критических пределов — доказательство того, что выбранный критический предел действительно контролирует опасный фактор [21].

Для каждой критической точки автоматически разрабатывается схема мониторинга, т.е. система постоянных наблюдений или измерений, которая позволяет удостовериться, что критические точки находятся под контролем. Программа автоматически формирует журналы мониторинга ККТ. Все данные и документы ХАССП могут формироваться и храниться в электронном виде.

Further, for every critical control point it is necessary to determine a critical limit — a value, which separates an acceptable level from unacceptable. Critical limits are determined by a HACCP workgroup for every CCP by one or several parameters. Herewith, information sources are published scientific data, experiment results, normative documents, expert recommendations, mathematical models etc. Critical limits must be concretized and confirmed. The confirmation of critical limits is a proof that the selected critical limit really controls a hazardous factor [21].

A monitoring scheme is automatically designed for every critical point. It is the system of constant observations or measurements, which allows assuring that critical points are under control. The program automatically forms CCP monitoring logs. All data and documents of HACCP can be formed and kept electronically.

## Обсуждение

Гарантия безопасности и качества продукции животного происхождения является важной задачей правительства и одной из главных функций государственных ветеринарных служб в странах всего мира [22].

Например, в ЕС была принята развернутая система законов, регламентирующих безопасность пищевых продуктов и надлежащее содержание животных, обязательных для всех стран — членов ЕС и частично применяемых в отношении стран, не являющихся членами ЕС, поставляющих животных и продукты животного происхождения в страны ЕС [11].

Согласно Anny Dentener [23] имеется достаточное число программных комплексов для поддержки системы HACCP на предприятии. Например, Associated Software Developers: HACCP Now (Великобритания, [www.haccpnow.co.uk](http://www.haccpnow.co.uk)) с версиями для компаний в зависимости от производительности, с обучающими блоками. Или EncosFIRM (Новая Зеландия, [www.encos.com](http://www.encos.com)) предлагает систему обработки информации и анализа рисков; даются реальные примеры с производства. Food Safety Manager (Канада, [www.foodprocessors.ca](http://www.foodprocessors.ca)) сфокусирована на анализе опасностей с учетом условий переработки и компонентного состава. HACCP Easy (США, [www.persyst.com.au](http://www.persyst.com.au)) состоит из 13 модулей, формирующих систему контроля, документооборота и мониторинга производства пищевого продукта. И много других.

На российском рынке можно выделить следующее программное обеспечение. Компания «IC-Rarus» ([www.rarus.ru](http://www.rarus.ru)) выпустила программный продукт совместно с фирмой «IC» — IC: Мясокомбинат 8.0 — являющийся комплексным решением, охватывающим основные контуры управления и учета, которое позволяет организовать единую информационную систему для управления различными аспектами деятельности мясоперерабатывающего предприятия. Одной из функциональных возможностей программного продукта является УПРАВЛЕНИЕ КАЧЕСТВОМ (нормативные положения HACCP) — учет рекламаций, контроль действий по устранению претензий.

Программный продукт «IC: MES Омега-Софт» ([www.omega-soft.ru](http://www.omega-soft.ru)) позволяет вывести качество конечной продукции на новый уровень, осуществляет прослеживаемость сырья, следит за безопасностью продукции и соблюдением стандартов HACCP, технических регламентов. В базовый пакет входят АРМ отделений: холодильника, склада вспомогательных материалов, отделение подготовки сырья, фаршесоставления, формовки фарша, мясных деликатесов, приготовления ливерной продукции.

При разработке программного решения от компании «Резон ВЦ» ([www.rezoncom.ru](http://www.rezoncom.ru)) были учтены многолетний опыт автоматизации предприятий мясоперерабатывающей отрасли, стандарты ИСО, HACCP,

## Discussion

Safety and quality assurance for produce of animal origin is an important task of the government and one of main functions of state veterinary services in countries worldwide [22].

For example, the EU has adopted the unfolded system of laws, which regulate food product safety and proper keeping of animals. They are mandatory for all EU Member States and partially applied in regard to the countries, which are not EU members, but supply animals and food of animal origin to the EU countries [11].

According to Anny Dentener [23] there are a sufficient number of program complexes for support of HACCP system in an enterprise. For example, Associated Software Developers: HACCP Now (Great Britain, [www.haccpnow.co.uk](http://www.haccpnow.co.uk)) has versions for companies depending on the performance, with teaching units. EncosFIRM (New Zealand, [www.encos.com](http://www.encos.com)) offers the system for information processing and risk analysis; the real examples from manufacture are given. Food Safety Manager (Canada, [www.foodprocessors.ca](http://www.foodprocessors.ca)) is focused on hazard analysis with taking into account processing conditions and component structure. HACCP Easy (USA, [www.persyst.com.au](http://www.persyst.com.au)) consists of 13 modules, which form a system of control, document flow and food product manufacture monitoring. And there are many others.

In the Russian market, it is possible to highlight the next software. The company «IC-Rarus» ([www.rarus.ru](http://www.rarus.ru)) released a program product together with the firm «IC» — «IC: Meat processing plant 8.0». It is a complex solution, which comprises basic circuits of control and accounting, and allows organizing a single information system for controlling different aspects of meat processing enterprise activities. One of the functional possibilities of the program product is QUALITY CONTROL (the HACCP normative provisions) — reclamation accounting, control of claim elimination.

The program product «IC: MES Omega-Soft» ([www.omega-soft.ru](http://www.omega-soft.ru)) allows increasing final product quality to a new level, tracing raw material, keeping track of product safety and compliance with the HACCP standards and technical regulations. The basic package includes AWS of the departments: refrigerator, auxiliary material storage, department for raw material processing, minced meat preparation, formation of forcemeat, delicate meats and liver product manufacturing.

The long experience in automation of meat processing enterprises, the ISO and HACCP standards, technological regulations were taken into account when designing a program solution of the company «Reason VC» ([80](http://www.re-</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

технологические регламенты. Система объединяет самые последние достижения в области информационных технологий и обеспечивает решение задач по пунктам контроля с подключением весового оборудования и ветеринарного контроля.

Анализ программного обеспечения показал, что принципы HACCP осуществляются в основном только на производстве (прием сырья — холодильник — ... — склад готовой продукции), нет сквозной прослеживаемости не только по всей трофологической цепи, но даже и внутри мясоперерабатывающего предприятия. В предлагаемой системе идентификация продукции производится «от поля до прилавка», т.е. на всех стадиях жизненного цикла.

В настоящее время, претерпев определенные изменения, дополнения и поправки, система HACCP признана на международном уровне как эффективная и результативная система управления производством безопасных продуктов питания. Основным направлением развития HACCP всегда было управление пищевой безопасностью, но постепенно на HACCP стали все больше смотреть как на нормативный инструмент, применяемый в правоприменительных целях для обеспечения пищевой безопасности [11].

### Заключение

Система управления безопасностью при производстве пищевого продукта, основанная на принципах HACCP, обязательна к применению во всем мире, включая Россию. Система, будучи разработанной и внедренной, помогает контролировать каждый этап пищевого производства. Однако система не будет эффективной без детального и последовательного описания всех процессов, требований к сырью и готовому продукту, условий мониторинга, и т.п. Логичность и процессный подход при описании системы, а также автоматические контроллеры на большинстве этапов облегчают перевод системы в программный комплекс. В статье описано алгоритмическое и программное обеспечение численной реализации «Дерева принятия решений» для каждого этапа трофологической цепи. Будучи уже налаженным, применение такого комплекса снижает трудозатраты на 50% и на 70% скорость фиксации несоответствия и адекватной реакции на неприемлемый риск.

zoncom.ru). The system integrates the latest achievements in information technology and provides a solution to the tasks according to the control points in connection with weighing equipment and veterinary control.

The software analysis showed that the HACCP principles are realized basically only in manufacturing (raw material reception — refrigerator — ... — storage of ready products); there is no complete traceability not only throughout the trophological chain, but even inside a meat processing enterprise. The offered system identifies products «from field to fork», i.e. at all stages of the life cycle.

At the present time, after specific changes, additions and corrections, the HACCP system is recognized at the international level as an effective and useful control system for manufacturing safety food products. The basic development direction of HACCP has always been food safety control, but, gradually, HACCP has been increasingly regarded as a normative instrument, which is used with law enforcement purposes for food safety assurance [11].

### Conclusions

The safety control system in food product manufacturing, which is based on the HACCP principles, is obligatory for use worldwide, including Russia. The designed and implemented system helps to control every stage of food manufacture. However, the system will not be effective without detailed and consistent description of all processes, requirements to raw material and ready products, monitoring conditions etc. The logicity and process approach in the system description and automatic controllers at the majority of stages facilitate system transformation into a program complex. The article describes the algorithms and software for numerical realization of the «Decision tree» for every stage of the trophological chain. Having been already established, such complex reduces labor costs by 50% and a speed of fixation of disparity and adequate reaction to unacceptable risk by 70%.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Лисицын А.Б., Костенко Ю.Г., Чернуха А.М., Протопопов И.И. Компьютерная методика формирования системы критических контрольных точек на примере технологического процесса производства вареных колбас // Хранение и переработка сельхозсырья. — 2007. — № 2 — С. 62–65.
2. Донченко Л.В., Надькта В.Д. Безопасность пищевой продукции. М.: ДеЛипринт, — 2010, ISBN 978-5-94343-092-3. — С. 539.
3. Судов Е.В., Левин А.И. CALS. Поддержка жизненного цикла продукции: Руководство по применению. М.: НИЦ Cals-технологий «Прикладная логистика», — 2002. — С. 131.
4. Мейес Т., Мортимор С. Эффективное внедрение HACCP. СПб.: Профессия, — 2008. ISBN 5-93913-069-0. — С. 288.
5. Рогов И.А., Дунченко Н.И., Позняковский В.М., Бердудина А.В., Купцова С.В. Безопасность продовольственного сырья и пищевых продуктов. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во. — 2007, ISBN 5940870589, 9785940870586. — С. 227.
6. Codex Alimentarius — Food Safety — European Commission. URL: [https://ec.europa.eu/food/safety/international\\_affairs/standard\\_setting\\_bodies/codex\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/international_affairs/standard_setting_bodies/codex_en) (дата обращения 01.12.2016)
7. Bryan F.L. Hazard analysis critical control point evaluations: a guide to identifying hazards and assessing risks associated with food preparation and storage // Library Cataloguing in Publication Data, WHO, Geneva. — 1992. — P. 80.
8. ГОСТ Р 51705.1-2001 «Системы качества. Управление качеством пищевых продуктов на основе принципов ХАССП. Общие требования» / М. Стандартиформ, 2001. — С. 10.
9. Горошко Г.П., Т.Н. Коршунова Т.Н., Козина З.А. К вопросу обоснования точек контроля показателей качества мясных продуктов // Мясная индустрия. — 2002. — № 4. — С. 44–47.
10. Leistner L. Neue Konzepte der Produktsicherung // Fleischwirtschaft. — 2000 г. — № 1. — P. 28–32.
11. Лисицын А.Б., Чернуха И.М., Макаренко Г.Ю., Берлова Г.А., Кузнецова О.А. Качество и безопасность продукции: создание и развитие систем управления. / под общ.ред.акад. РАСХН А.Б. Лисицына. М.: Эдиториал сервис, 2010, ISBN 978-5-9901348-3-6. — С. 312. (С. 206–218).
12. Чайка И.И., Аршакуни В.Л. Системы качества, основанные на принципах ХАССП: разработка и сертификация // Стандарты и качество. — 2001. — № 5–6. — С. 137–139.
13. Лисицын А.Б., Сизенко Е.И., Чернуха И.М., Алексахина В.А., Семенова А.А., Дурнев А.Д. Мясо и здоровое питание. М.: ВНИИМП. — 2007, ISBN 5-901768-18-3. — С. 289.
14. Хворова Ю.А., Чернуха И.М. Методология управления несоответствиями по цепи от поля до потребителя // Все о мясе. — 2012. — № 3 — С. 32–35.
15. Лукин А.А. Управление качеством и безопасностью мясного хлеба на основе принципов ХАССП // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Экономика и менеджмент. — 2013. — Т. 7. — № 2 — С. 152–158.
16. Титов Е.И., Митасева Л.Ф., Колотвина С.В., Соломко А.О. Разработка типового плана ХАССП для производства мясного продукта // Все о мясе — 2011. — № 4 — С. 54–58.
17. Красуля О.Н., Малофеева Ю.С. Реализация системы ХАССП в технологии производства вкусо-ароматических добавок // Мясная индустрия. — 2006. — № 3 — С. 32–35.
18. ГОСТ Р ИСО 22005-2009. Прослеживаемость в цепочке производства кормов и пищевых продуктов. Общие принципы и основные требования к проектированию и внедрению системы. — М.: Стандартиформ, 2010. — С. 12.
19. HACCP на процессах откорма животных и доставки их на перерабатывающие предприятия // Все о мясе — 1998 г. — № 2. — С. 27–29.
20. ГОСТ 33182-2014 «Промышленность мясная. Порядок разработки системы ХАССП на предприятиях мясной промышленности» / М.: Стандартиформ, 2015. — С. 15.
21. United States Department of Agriculture. URL: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/ffsis/topics/regulatory-compliance/haccp/resources-and-information/haccp-validation> (дата обращения 01.12.2016)
22. Федеральный закон РФ «О техническом регулировании» от 27.12.2002 N 184-ФЗ (действующая редакция, 2016).
23. HACCP Software. URL: [http://www.adecron.co.nz/software\\_archive/HACCP\\_Software\\_overview\\_\(14\).pdf](http://www.adecron.co.nz/software_archive/HACCP_Software_overview_(14).pdf) (дата обращения 01.12.2016)

## REFERENCES

1. Lisitsyn A.B., Kostenko Ju.G., Chernukha A.M., Protopopov I.I. Komp'yuternaja metodika formirovanija sistemy kriticheskikh kontrol'nyh toчек na primere tehnologicheskogo processa proizvodstva varenyh kolbas // Hranenie i pererabotka sel'hozsyr'ja — 2007. — № 2. — P. 62–65.
2. Donchenko L.V., Nadykta V.D. Bezopasnost' pishhevoj produkcii. M.: DeLiprint, 2010, ISBN 978-5-94343-092-3. — P. 539.
3. Sudov E.V., Levin A.I. CALS. Podderzhka zhiznennogo cikla produkcii: Rukovodstvo po primeneniju. M.: NIC Cals-tehnologij «Prikladnaja logistika». — 2002. — P. 131.
4. Mejes T., Mortimor S. Jeffektivnoe vnedrenie HACCP. SPb.: Professija, 2008, ISBN 5-93913-069-0. — P. 288.
5. Rogov I.A., Dunchenko N.I., Poznjakovskij V.M., Berdudina A.V., Kupcova S.V. Bezopasnost' prodovol'stvennogo syr'ja i pishhevyyh produktov. Novosibirsk: Sib. univ. izd-vo, 2007, ISBN 5940870589, 9785940870586. — P. 227.
6. Codex Alimentarius — Food Safety — European Commission. URL: [https://ec.europa.eu/food/safety/international\\_affairs/standard\\_setting\\_bodies/codex\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/international_affairs/standard_setting_bodies/codex_en) (data obrashhenija 01.12.2016)
7. Bryan, F.L. Hazard analysis critical control point evaluations: a guide to identifying hazards and assessing risks associated with food preparation and storage // Library Cataloguing in Publication Data, WHO, Geneva. — 1992. — P. 80.
8. ГОСТ Р 51705.1-2001 «Системы качества. Управление качеством пищевых продуктов на основе принципов HACCP. Общие требования» / М. Стандартиформ, 2001. — P. 10.
9. Goroshko G.P., T.N. Korshunova T.N., Kozina Z.A. K voprosu obosnovanija toчек kontrol'ja pokazatelej kachestva mjasnyh produktov // Meat industry. — 2002. — № 4. — P. 44–47.
10. Leistner L. Neue Konzepte der Produktsicherung // Fleischwirtschaft. — 2000 г. — № 1. — P. 28–32.
11. Lisitsyn A.B., Chernukha I.M., Makarenkova G.Ju., Berlova G.A., Kuznetsova O.A. Kachestvo i bezopasnost' produkcii: sozdanie i razvitie sistem upravlenija. / pod obshh.red.akad. RAAS A.B. Lisicyna. M.: Jeditorial servis, 2010, ISBN 978-5-9901348-3-6. — P. 312. (P. 206–218)
12. Chajka I.I., Arshakuni V.L. Sistemy kachestva, osnovannye na principah HACCP: razrabotka i sertifikacija // Standarty i kachestvo — 2001. — № 5–6 — P. 137–139.
13. Lisitsyn A.B., Sizenko E.I., Chernukha I.M., Aleksahina V.A., Semenova A.A., Durnev A.D. Mjaso i zdorovoe pitanie. M.: VNIIMP, 2007, ISBN 5-901768-18-3. — P. 289.
14. Khvorova Ju.A., Chernukha I.M. Metodologija upravlenija nesootvetstvijami po cepi ot polja do potrebitelja // Vse o myase. — 2012. — № 3 — P. 32–35.
15. Lukin A.A. Upravlenie kachestvom i bezopasnost'ju mjasnogo hleba na osnove principov HACCP // Vestnik Juzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Jekonomika i menedzhment — 2013. — Vol. 7. — № 2. — P. 152–158.
16. Titov E.I., Mitaseva L.F., Kolotvina S.V., Solomko A.O. Razrabotka tipovogo plana HACCP dlja proizvodstva mjasnogo produkta // Vse o myase — 2011. — № 4 — P. 54–58.
17. Krasulja O.N., Malofeeva Ju.S. Realizacija sistemy HACCP v tehnologii proizvodstva vkuso-aromaticheskikh dobavok // Meat industry — 2006. — № 3. — P. 32–35.
18. ГОСТ Р ИСО 22005-2009. Proslezhivaemost' v cepochke proizvodstva kormov i pishhevyyh produktov. Obshhie principy i osnovnye trebovanija k proektirovaniju i vnedreniju sistemy. — M.: Standartinform, 2010. — P. 12.
19. HACCP na processah otkorma zhivotnyh i dostavki ih na pererabatyvajushhie predprijatje // Vse o myase. — 1998. — № 2 — P. 27–29.
20. ГОСТ 33182-2014 «Promyshlennost' mjasnaja. Porjadok razrabotki sistemy HACCP na predpriyatijah mjasnoj promyshlennosti» / M.: Standartinform, 2015. — P. 15.
21. United States Department of Agriculture. URL: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/ffsis/topics/regulatory-compliance/haccp/resources-and-information/haccp-validation> (data obrashhenija 01.12.2016)
22. Federal'nyj zakon RF «O tehničeskom regulirovanii» ot 27.12.2002 N 184-FZ (dejstvujushhaja redakcija, 2016).
23. HACCP Software. URL: [http://www.adecron.co.nz/software\\_archive/HACCP\\_Software\\_overview\\_\(14\).pdf](http://www.adecron.co.nz/software_archive/HACCP_Software_overview_(14).pdf) (data obrashhenija 01.12.2016)

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

## Принадлежность к организации

**Бородин Александр Викторович** — доктор технических наук, профессор, профессор кафедры «Информационных технологий, математики и физики», Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина  
109472, г. Москва, ул. Скрябина, д. 23  
Тел.: +7-495-377-94-17  
E-mail: av.borodin.45@mail.ru

**Чернуха Ирина Михайловна** — доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, 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, д. 26  
Тел.: +7-495-676-97-18  
E-mail: imcher@inbox.ru

**Никитина Марина Александровна** — кандидат технических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, руководитель направления Информационных технологий, Центра «Экономико-аналитических исследований и информационных технологий», Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова  
109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26  
Тел.: +7-495-676-92-14  
E-mail: nikitinama@vniimp.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 02.12.2016

## AUTHOR INFORMATION

## Affiliation

**Borodin Alexander Viktorovich** — doctor of technical sciences, professor, professor of chair «Information technologies, mathematics and physics», Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology — K.I. Skryabin MVA  
109472, г. Москва, Skryabina str., 23  
Tel.: +7-495-377-94-17  
E-mail: av.borodin.45@mail.ru

**Chernukha Irina Mihailovna** — doctor of technical sciences, professor, corresponding members of RAS, leading research scientist of Experimental clinic — laboratory of biologically active substances of an animal origin of the V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel: +7-495-676-97-18  
E-mail: imcher@inbox.ru

**Nikitina Marina Aleksandrovna** — 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, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute  
109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel: +7-495-676-92-14  
e-mail: nikitinama@vniimp.ru

## Contribution

The 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 02.12.2016

# STUDY ON THE BIOLOGICAL VALUE OF PROTEINS WITH HYPOTENSIVE PROPERTIES FROM AIR-DRIED BEEF

## ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ БЕЛКОВ СЫРОВАЯЛЕННЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ ГОВЯДИНЫ С ГИПОТЕНЗИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Kovaleva O.A., Zdrabova E.M

The Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin, Orel, Russia

**Ключевые слова:** пищевые белки, биологическая ценность продукта, сыровяленые мясные продукты.

**Keywords:** food proteins, product biological value, air-dried meat products.

### Аннотация

В настоящей работе изучено влияние внесения стартовых культур в технологию вяления продуктов из говядины на степень гидратации и растворимости белков. Рассмотрены процессы гидролиза белковых макромолекул на дипептиды, полипептиды, свободные аминокислоты. Показано, что сыровяленые продукты из говядины, содержащие стартовые культуры обладают высокой биологической ценностью. Отмечено, что микроорганизмы, входящие в состав стартовых культур, обладают высокой протеолитической активностью и ускоряют биохимическое превращение белков мяса при посоле, за счет чего протекание биохимических процессов идет быстрее. Было установлено молекулярно-массовое распределение белковых фракций.

Наиболее перспективными для изучения являются производные белков мяса — пептиды, которые могут оказывать физиологическое воздействие на организм.

В данном исследовании дана оценка протеинового комплекса сыровяленых продуктов из говядины, выработанных по различным технологиям вяления, показано, что наибольшее количество белковых спектров в сыровяленых продуктах из говядины с применением стартовых культур находится в зонах белков с потенциальной гипотензивной направленностью (средней и легкой зонах с молекулярной массой 50 кДа — 70 кДа и 5 кДа — 20 кДа соответственно).

Показано, что при использовании традиционной технологии вяления накопление белковых спектров в мясе отмечается в зоне тяжелых фракций с молекулярной массой 85 кДа — 100 кДа, средняя и легкая фракции выражены слабо. Наиболее высокая скорость гидролиза ферментами желудочно-кишечного тракта сыровяленых мясных продуктов со стартовыми культурами позволяет в большей степени спрогнозировать степень утилизации белков организмом человека. Установлено, что наибольшие ростовые показатели у лабораторных животных, в рацион которых добавлены сыровяленые продукты со стартовыми культурами. Прирост живой массы за 30 дней кормления составил в опытных группах 14,37 г и 12,82 г соответственно по сравнению с контрольными группами.

### Введение

На сегодняшний день разработана государственная политика в области здорового питания, основные положения которой предусматривают расширение ассортимента, сохранение полезных свойств продук-

### Abstract

The present paper examines an effect of starter culture incorporation into the technology of air-dried beef products on a degree of protein hydration and solubility. The processes of the protein macromolecule hydrolysis on dipeptides, polypeptides and free amino acids are described. It was shown air-dried beef products that contain starter cultures had the high biological value. It was noticed that microorganisms being constituents of starter cultures had the high proteolytic activity and accelerated the biochemical transformation of meat proteins upon curing, which resulted in higher rates of biochemical processes. The molecular weight distribution of protein fractions was determined.

The derivatives of meat proteins, peptides, which can have a physiological effect on the body, are the most promising for studying.

This study presents an assessment of a protein complex of air-dried beef products made according to different technologies of air drying and shows that the majority of protein spectra in the air-dried beef products with starter cultures are in the zones of proteins with potential hypotensive properties (medium and light zones with molecular weights of 50 kDa — 70 kDa and 5 kDa — 20 kDa, respectively).

It is shown that when using the traditional technology of air drying, an accumulation of the protein spectra in meat was observed in the zone of heavy fractions with a molecular weight of 85 kDa — 100 kDa, the medium and light fractions were poorly pronounced. The highest rate of hydrolysis of the air-dried meat products with starter cultures by the enzymes of the gastrointestinal tract makes it possible to predict in a greater degree a level of protein utilization by the human body. It was established that the highest growth indicators were in the laboratory animals, which diet was supplemented with air-dried products that contained starter cultures. A live weight gain over a 30 day period of feeding was 14.37 g and 12.82 g, respectively, in the experimental groups compared to the control groups.

### Introduction

At present, the state policy in the field of healthy nutrition has been developed, the main provisions of which stipulate an increase in an assortment and maintenance of product healthy properties (The Decree of the Govern-

тов (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25.10.2010г № 1873-р «Об утверждении Основ государственной политики РФ в области здорового питания населения на период до 2020 г.»). Биологическая ценность мяса весьма высокая. Она значительно выше, чем биологическая ценность казеина молока, принятая за стандарт. Известно, что по скорости переваривания протеолитическими ферментами белки мяса занимают второе место (после рыбных и молочных) [1].

Оценка количественных и качественных параметров протеинового комплекса пищевых продуктов проводится для выяснения способности данного продукта питания удовлетворить потребность организма в незаменимых аминокислотах. Степень усвоения пищевого белка зависит от эффективности его распада под влиянием ферментов желудочно-кишечного тракта [2].

Особое значение в основе жизнедеятельности органов и систем имеет недостаток высокоусвояемых белков, так как многие аминокислоты, составляющие первичную структуру белков, не синтезируются в организме и должны поступать в организм вместе с пищей. Биологическая ценность отражает способность белковых компонентов продуктов перевариваться при вступлении в сбалансированную связь с аминокислотами [3].

Вяление продуктов — один из способов консервирования мясных продуктов, в том числе, сохранения полезных веществ в продуктах (жирных кислот, аминокислот, минеральных веществ). В сыровяленых продуктах содержится молочнокислая микрофлора, оказывающая положительное воздействие на организм человека. Высокая биологическая ценность сохраняется, благодаря отсутствию термической обработки [4].

Таким образом, исследования перспективы использования молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий (пробиотиков) в технологии ускоренного получения сыровяленых продуктов, что позволяет сохранить высокую пищевую ценность мясного продукта, является актуальным [5].

В частности в литературе имеются сведения о том, что в процессе вяления в ходе биохимических процессов образуются сложные белково-липидные комплексы, которые определяют уникальные вкусовые, потребительские, а также полезные характеристики конечного продукта [6].

Целью данного исследования являлось изучение качественных и количественных параметров протеинового комплекса сыровяленых продуктов из говядины с применением в технологии производства стартовых культур, а также оценка степени усвояемости белков конечного продукта как показатель способности наиболее полно удовлетворить потребность организма в незаменимых аминокислотах.

ment of the Russian Federation No. 1873-p of 25.10.2010 «About approval of the Foundations of the State Policy of the RF in the area of healthy nutrition of the population for the period up to 2020»). The biological value of meat is very high. It is significantly higher than the biological value of milk casein taken as a reference. It is known that meat proteins occupy the second place (after fish and milk proteins) in terms of the rate of digestion by proteolytic enzymes [1].

Quantitative and qualitative parameters of the food protein complex are assessed to determine an ability of a food product to satisfy the body requirements for essential amino acids. The degree of food protein digestion depends on the effectiveness of its breakdown under the influence of the enzymes of gastrointestinal tract [2].

The deficiency of highly digestible proteins is of special importance for the vital activity of organs and systems as many amino acids that are constituents of the protein primary structure are not synthesized in the body and should enter the body with food. The biological value reflects an ability of food protein components to be digested upon entering into a balanced relationship with amino acids [3].

Air drying of products is one of the methods of meat product preservation, including, maintenance of healthy components in products (fatty acids, amino acids, minerals). Air-dried products contain lactic acid microflora that has a positive effect on the human body. The high biological value is maintained due to the absence of heat treatment [4].

Therefore, an evaluation of the prospects of using lactic acid microorganisms and bifidobacteria (probiotics) in the technology of accelerated production of air-dried products, which allows maintaining the high food value of meat products, is topical [5].

In particular, there is information in the scientific literature that the protein-lipid complexes are formed in the course of the biochemical processes, which determine the unique taste, consumer and healthy properties of the finished product [6].

The aim of this research was to study quantitative and qualitative parameters of the protein complex in air-dried beef products with the use of starter cultures in the production technology, as well as to assess a degree of protein digestibility in the finished product as an indicator of an ability to more completely meet the requirements of the body for essential amino acids.

## Материалы и методы

Объектами исследований явились:

- мясной продукт из говядины с бактериальным препаратом-1 (БП-1), в состав которого входили молочно-кислые бактерии *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus plantarum*, взятые в соотношении 1:1;
- мясной продукт из говядины с бактериальным препаратом-2 (БП-2), в состав которого входили молочно-кислые *Staphylococcus xylosum*, *Lactobacillus rhamnosus*, взятых в соотношении 1:1;
- контроль — сыровяленая говядина, выработанная по традиционной технологии без применения стартовых культур.

Изготовление мясных цельномышечных сыровяленых продуктов осуществляли по рецептуре сыровяленого продукта — говядина сыровяленая «Пикантная». Процесс включал следующие этапы: посол сырья (введение посолочной смеси со стартовыми культурами путем инъектирования), выдержка (температура до 4 °С, влажность воздуха 50–60%, в течении 96 часов), сушка (15 суток при температуре +14–16 °С и влажности воздуха в начале 74–78%, с постепенным снижением до 55–60%).

Электрофоретическое разделение образцов проводили с помощью вертикального электрофореза в пластинах полиакриламидного геля размерами 125×125×1 мм, при температуре 20 °С [7]. Исследуемые образцы наносили в карманы под буфер с помощью микродозатора или микрошприца в количестве 10 мкл. Содержание в буфере для окрашивания глицерина, раствор белка окрашенный, бромфеноловым синим, хорошо ляжет под буфер. В первые 10 мин сила тока составляла 30 мА нагель 125×125×1 мм., после вхождения образца вгель — 60 мА. После окончания электрофореза выявление белковых полос проводили окрашиванием геля в уксусно-спиртовом растворе кумасси. Предварительную пробоподготовку белков для электрофореза проводили по модифицированной методике с 10% раствором сахарозы.

Биологическая оценка сыровяленых продуктов, выработанных по различным технологиям, осуществлялась на растущих лабораторных мышах — самцах в течение 30 дней [3]. Животные содержались в условиях лабораторий вивария. Помещения, предназначенные для содержания животных, имели приточно-вытяжную вентиляцию, рециркуляторы, искусственное освещение с системой программируемой фотопериодичности, температурой воздуха 20–22 °С и влажностью воздуха 50–55%.

Животные были разделены на 4 группы:

- контрольная группа №1 — обычный виварный рацион;
- контрольная группа №2 — в рацион введен сыровяленый продукт из говядины без применения в технологической схеме стартовых культур, в количестве 0,034 г на особь, 0,2 г на группу;
- опытная группа № 1 — в рацион введен сыровяленый продукт из говядины с применением БП-1, в количестве 0,034 г на особь, 0,2 г на группу;

## Materials and methods

The subjects of the research were:

- a beef product with the bacterial preparation-1 (BP-1), which included lactic acid bacteria *Staphylococcus carnosus* and *Lactobacillus plantarum* in a ratio of 1:1;
- a beef product with the bacterial preparation-2 (BP-2), which included lactic acid bacteria *Staphylococcus xylosum* and *Lactobacillus rhamnosus* in a ratio of 1:1;
- control — air-dried beef produced under the traditional technology without starter cultures.

Production of meat whole muscle air-dried products was carried out using the recipe of an air-dried beef «Pikantnaya». The process included the following stages: raw material curing (addition of a curing mixture with starter cultures by injecting), holding (a temperature of 4 °C and air humidity of 50–60% for 96 hours), drying (15 days at a temperature of +14–16 °C and air humidity of 74–78% at the beginning, and a gradual decrease up to 55–60%).

The electrophoretic separation of the samples was carried out with vertical electrophoresis using the polyacrylamide gel plates (125×125×1 mm) at a temperature of 20 °C [7]. The test samples were injected into the pockets under the buffer using a microdispenser or microsyringe in an amount of 10 µl. A dye buffer contained glycerol; the protein solution stained with Bromophenol Blue was adequately placed under the buffer. A current at 30 mA was applied to the gel (125×125×1 mm) during the first 10 min. and at 60 mA after a sample entered the gel. After the end of electrophoresis, the protein bands were revealed by gel staining in an alcohol/acetic acid Coomassie solution. Preliminary sample preparation of proteins for electrophoresis was carried out according to the modified method with 10% of sucrose solution.

A biological assessment of air-dried products produced by different technologies was carried out on growing laboratory male rats for 30 days [3]. The animals were kept in the conditions of a vivarium. The rooms where the animals were kept had intake and exhaust ventilation, recirculators, artificial lighting with a system of programmed photoperiodicity, an air temperature of 20–22 °C and air humidity of 50–55%.

The animals were divided into 4 groups:

- Control group № 1 — a usual diet of a vivarium;
- Control group № 2 — a diet was supplemented with an air-dried beef product without starter cultures in an amount of 0.034/individual, 0.2 g/group.
- Experimental group № 1 — a diet was supplemented with an air-dried beef product with BP-1 starter culture in an amount of 0.034/individual, 0.2 g/group.

- опытная группа № 2 — в рацион введен сыровяленый продукт из говядины с применением БП-2, в количестве 0,034 г на особь, 0,2 г на группу.

Проводили оценку прироста массы тела индивидуальным взвешиванием животных на лабораторных электронных весах по разнице масс в начале и в конце эксперимента по истечении 30 дней.

Переваримость экспериментальных образцов определяли в опытах *in vitro* по пепсину и трипсину. Метод заключается в последовательном воздействии на белковые вещества исследуемого продукта системой протеиназ, состоящей из пепсина и трипсина. Накопление продуктов гидролиза определяют по цветной реакции Лоури, выражают в мкг/1 г. Математическая обработка результатов экспериментальных исследований проведена по методу по методу оптимизации средней квадратичной ошибки.

### Результаты и обсуждение

Японские ученые Nakashima, Fujita [2, 6] установили гипотензивные свойства пептидов мяса вводя их орально лабораторным крысам. Этими исследованиями показаны гипотензивные свойства пептидов мясных продуктов, которые находятся в средней и легкой зонах электрофоретической подвижности. Как показали данные наших исследований, при электрофоретическом разделении суммарных белков готового продукта, накапливающихся в процессе вяления (Рисунок 1), наибольшее количество белковых спектров находится в средней фракции белков образца с БП-1 на 4–8 день вяления (от 30 кДа — 50 кДа). В дальнейшем происходит последовательное накопление белков легкой фракции (5 кДа — 16 кДа).

Электрофореграмма суммарных белков сыровяленой говядины с БП-2 в процессе вяления выявила, что в образце с БП-2 на 6 день вяления происходит наибольшее накопление белковых спектров в легкой фракции (5 кДа — 15 кДа) (Рисунок 2).

Электрофорез суммарных белков экспериментальных образцов показал, что наибольшее количество белков наблюдается в легкой и средней зонах электрофоретической подвижности с молекулярной массой 50 кДа — 70 кДа и 5 кДа — 20 кДа соответственно, в которой располагаются белки-карнитины и белки-карнозины с потенциально гипотензивной направленностью с молекулярной массой от 5 кДа до 7 кДа [8].

Исследованиями Sasaki, Itoh [6] установлено, что при идентификации в плазме крови пептидов мяса карнозина и карнитина, биодоступность мясных белков после приема говядины увеличивается. Наши исследования переваримости белков сыровяленой говядины протеолитическими ферментами подтвердили данное утверждение. В связи с чем считаем, что определение наличия пептидов мяса карнозина и карнитина методом электрофореза в ПААГ позволяет спрогнозировать степень усвояемости и утилизации мясных

- Experimental group № 2 — a diet was supplemented with an air-dried beef product with BP-2 starter culture in an amount of 0.034/individual, 0.2 g/group.

A body weight gain was measured by individual weighing animals on a laboratory electronic scale as a difference between the weights at the beginning and at the end of the experiment after 30 days.

Digestibility of the experimental samples was detected in the experiments *in vitro* by pepsin and trypsin. The method consists in the successive exposure of the protein substances of a test product to a proteinase system that comprised of pepsin and trypsin. Accumulation of the hydrolysis products is assessed by the Lowry color reaction and expressed in  $\mu\text{g/g}$ . Mathematical processing of the experimental results was carried out by the method of mean square error optimization.

### Results and discussions

The Japanese scientists Nakashima, Fujita [2, 6] established the hypotensive properties of meat peptides administering them orally to the laboratory rats. These investigations showed the hypotensive properties of meat product peptides, which were in the medium and light zones of the electrophoretic mobility. As the data of our investigations showed, upon electrophoretic separation of total proteins of a finished product that accumulate in the process of air drying (Fig. 1), the largest number of protein spectra was in the medium protein fraction of the BP-1 sample on the 4–8 days of air drying (from 30 kDa — 50 kDa). A successive accumulation of the protein light fraction (5 kDa — 16 kDa) occurred later on.

The electrophoregram of total proteins in air-dried beef with BP-2 in the process of air-drying showed that the highest accumulation of the protein spectra in the light fraction (5 kDa — 15 kDa) took place in the sample with BP-2 on the 6<sup>th</sup> day of air-drying (Fig. 2).

Electrophoresis of total proteins of the experimental samples showed that the highest number of proteins was in the light and medium zones of the electrophoretic mobility with the molecular weight of 50 kDa — 70 kDa and 5 kDa — 20 kDa, respectively, in which carnitine and carnosine with the potential hypotensive activities (molecular weights of 5 kDa to 7 kDa) were located [8].

Sasaki, Itoh [6] established that when identifying meat peptides, carnosine and carnitine, in the blood plasma, meat protein bioavailability increased after beef intake. Our investigations of protein digestibility of air-dried beef by proteolytic enzymes confirmed this statement. In this connection, we suggest that the detection of the presence of meat peptides, carnosine and carnitine, by electrophoresis in the polyacrylamide gel allows predicting a degree of digestibility and utilization of meat proteins by the

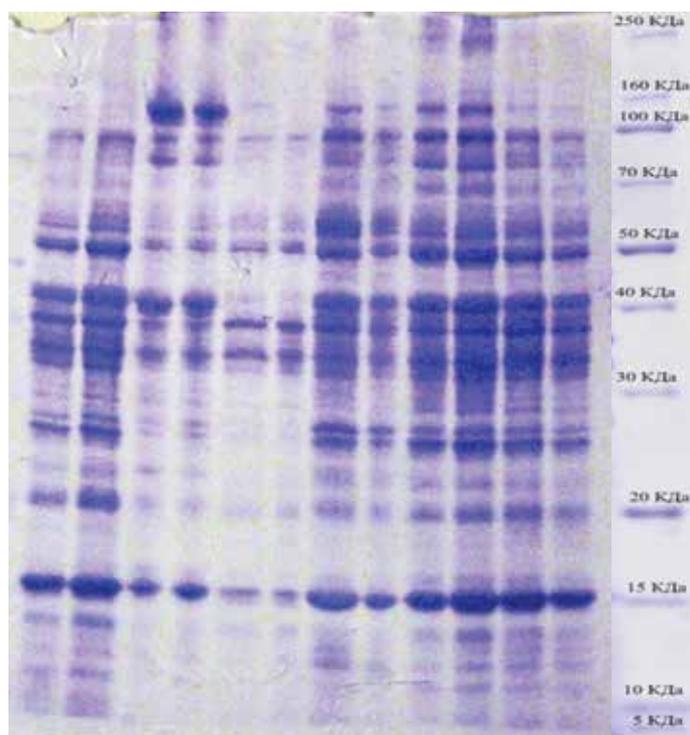


Figure 1. Electrophoregram of the sample with BP-1 (1, 2,3, 4, 5, 6- 2, 4, 6, 8, 10,12 days of air drying, 7 — protein molecular weight marker Page Ruler (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 160, 250 kDa, Helicon, USA)

Рис. 1. Электрофореграмма образца с БП-1 (1, 2,3, 4, 5, 6- 2, 4, 6, 8, 10, 12 дней вяления, 7 — маркер молекулярной массы белков Page Ruler (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 160,250 kDa, Helicon, США)

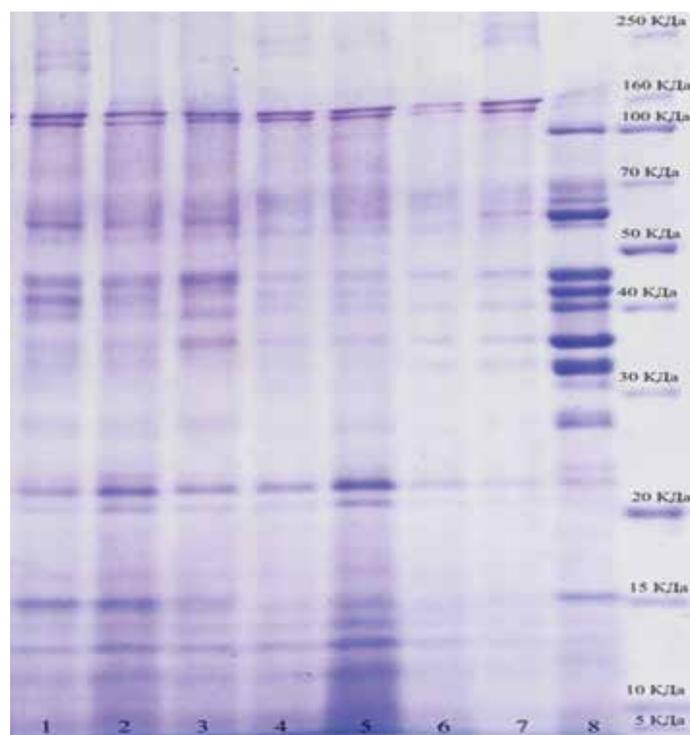


Figure 2. Electrophoregram of the sample with BP-2 (1, 2,3, 4, 5, 6- 2, 4, 6, 8, 10,12 days of air drying, 7 — protein molecular weight marker Page Ruler (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 160, 250 kDa, Helicon, USA)

Рис. 2. Электрофореграмма образца с БП-2 (1, 2, 3, 4, 5, 6-2, 4, 6, 8, 10, 12 дней вяления, 7 — маркер молекулярной массы белков Page Ruler (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50,70, 100, 160, 250 kDa Helicon, США)

белков организмом человека. Нами отмечено, что при исследовании переваримости исследуемых образцов по пепсину и трипсину, наиболее высокая скорость гидролиза ферментами желудочно-кишечного тракта происходит в образцах сыровяленого мяса с применением стартовых культур как в случае с применением БП-1, так и с БП-2 (Таблица 1).

На основании полученных данных можно утверждать, что высокая скорость гидролиза белков мяса связана с образованием средне молекулярных продуктов гидролиза, более доступных действию пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта. Аналогичные выводы были получены Т.М. Гиро и С.В. Давыдовой при исследовании функциональных мясных продуктов с добавлением тыквенного порошка [9].

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение в рацион лабораторным животным — лабораторным мышам сыровяленых продуктов из говядины оказывает положительное влияние на рост и развитие животных (Таблица 2). Прирост живой массы за

human body. We noticed that when studying digestibility of the test samples by pepsin and trypsin, the highest rate of hydrolysis by the enzymes of the gastrointestinal tract occurred in the samples of air-dried meat with starter cultures as was in the case of using both BP-1 and BP-2 (Table 1).

Based on the obtained data, it can be stated that the high rate of meat protein hydrolysis is associated with formation of medium molecular weight hydrolysis products that are more accessible to the action of digestive enzymes of the gastrointestinal tract. The similar conclusions were made by T.M. Giro and S.V. Davidova when studying functional meat products with addition of powdered pumpkin [9].

The obtained data indicate that addition of air-dried beef products into a diet of laboratory animals (laboratory rats) has a positive effect on animal growth and development (Table 2). A live weight gain over a 30 day period of

Table 1. Assessment of meat product digestibility | Табл. 1. Оценка переваримости мясных продуктов

Samples   Образцы	Digestibility in vitro mg tyrosin /g protein   Переваримость in vitro мг тирозина/г белка		
	Pepsin   Пепсин	Trypsin   Трипсин	Total   Сумма
Control   Контроль	11.24±0.11	11.84±0.16	23.08±0.21
Meat product with BP-1   Мясной продукт с БП-1	13.02±0.07*	12.62±0.06*	25.64±0.16
Meat product with BP-2   Мясной продукт с БП-2	12.88±0.14*	11.97±0.14	24.85±0.11*

\* $p \leq 0.05$  (a possibility of an error between the control and experimental samples)

\* $p \leq 0,05$  (вероятность ошибки между контролем и опытными образцами)

Table 2. Growth indicators in laboratory animals | Табл. 2. Ростовые показатели лабораторных животных

Group   Группа	Live weight at the beginning of the experiment, g   Живая масса при постановке опыта в г	Live weight at the end of the experiment, g   Живая масса в конце опыта, в г	Live weight gain over a 30 day period   Прирост живой массы за 30 дней	Average daily gain over a 30 day period   Среднесуточный прирост за 30 дней	
				g   г	%
Control-1   Контроль-1	18.76±0.23	29.48±1.14	10.72±0.12	2.05±0.03	100
Control-2   Контроль-2	18.68±0.16	30.46±1.05	11.78±0.23	2.07±0.11	101.3
Meat product (with BP-1)   Мясной продукт (с БП-1)	18.61±0.16*	32.98±1.09*	14.37±1.16*	2.11±0.14	104.7
Meat product (with BP-2)   Мясной продукт (с БП-2)	18.75±1.13*	31.57±0.69	12.82±0.32**	2.09±0.15	102.5

\* $p \leq 0.05$  (a possibility of an error between the control and experimental samples)

\*\* $p \leq 0,05$  (вероятность ошибки между контролем и опытными образцами)

30 дней кормления составил в опытных группах 14,37 г и 12,82 г соответственно, по сравнению с контрольной группой-1, и контрольной группой-2. Значение прироста живой массы в контрольной группе-2 составило 11,78 г, контрольной группы-1 составило 10,72 г.

Наибольший среднесуточный прирост живой массы за 30 суток в группах, в рацион которых были добавлены мясные продукты со стартовыми культурами. Самый высокий прирост в группе животных, в рацион которых был добавлен мясной продукт с БП-1, он составил 2,11 г, с БП-2 прирост составил 2,09 г. Разница в результатах двух контрольных групп незначительна и находится в пределах ошибки опыта. Динамика прироста свидетельствует о достаточной усвояемости продукта, об отсутствии лишнего веса у экспериментальных животных и об отсутствии нагрузки на печень и сердце при введении в рацион животных сыровяленых мясных продуктов, произведенных с использованием стартовых культур.

### Выводы

В результате полученных исследований по оценке протеинового комплекса сыровяленых продуктов из говядины, выработанных по различным технологиям вяления, показано, что наибольшее количество белковых спектров в сыровяленых продуктах из говядины с применением стартовых культур находится в зонах белков с потенциальной гипотензивной направленностью (средней и легкой зонах с молекулярной массой 50 кДа — 70 кДа и 5 кДа — 20 кДа соответственно). Наибольшее количество белковых спектров (5 спектров) отмечено в средней фракции белков образца с БП-1 на 4–8 день вяления. В образце с БП-2 на 6 день вяления происходит наибольшее накопление белковых спектров (6 спектров) в легкой фракции белков. При использовании традиционной технологии вяления накопление белковых спектров в мясе отмечается в зоне тяжелых фракций с молекулярной массой 85 кДа –100 кДа, средняя и легкая фракции выражены слабо.

Полученные данные показывают возможность введения в ежедневный рацион животных сыровяленых продуктов из говядины. Показан положительный эффект на рост и развитие лабораторных животных.

feeding was 14.37 g and 12.82 g, respectively, in the experimental groups. A value of a live weight gain was 11.78 g in control group 2 and 10.72 g in control group 1.

The largest average daily gain over a 30 day period was in the groups, which diet was supplemented with the meat products containing starter cultures. The highest gain (2.11 g) was in the animal group, which diet contained the meat product with BP-1; when adding BP-2 into the diet, the gain was 2.09 g. The difference in the results of two control groups was insignificant and was within the experimental error. The gain dynamics suggests a sufficient digestibility of a product, an absence of an excessive weight in the experimental animals and an absence of a load on liver and heart when adding air-dried meat products with starter cultures into an animal diet.

### Conclusions

As a result of the performed research on an assessment of the protein complex of air-dried beef products made according to different technologies of air drying, it was shown that the highest number of the protein spectra in the air-dried beef products with starter cultures were in the zones of proteins with the potential hypotensive activity (the light and medium zones with the molecular weights of 50 kDa — 70 kDa and 5 kDa — 20 kDa, respectively). The highest number of the protein spectra (5 spectra) was observed in the protein medium fraction of the BP-1 samples on the 4–8 days of air-drying. In the BP-2 sample, the highest accumulation of the protein spectra was in the protein light fraction on the 6<sup>th</sup> day. When using the traditional air-drying technology, an accumulation of the protein spectra in meat was observed in the zone of the heavy fractions with a molecular weight of 85 kDa –100 kDa, the medium and light fractions were poorly pronounced.

The obtained data show the possibility to add air-dried beef products into an everyday diet of animals. The positive effect on growth and development of laboratory animals was shown. The highest live weight gain over a

Наибольший прирост живой массы опытных животных за 30 дней кормления показан в опытных группах. Усвояемость белков сыровяленого мяса из расчета переваримости *in vitro* по пепсину и трипсину выше на 2,56 мг тирозина/г белка в образцах с применением стартовых культур, содержащих молочно-кислые бактерии *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus plantarum*.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Левахин, В.И. Основные направления и способы повышения эффективности производства говядины и улучшения ее качества / В.И. Левахин, И.Ф. Горлов, В.В. Калашников // Вестник РАСХН-ВолгГТУ. — 2006. — С. 172–174.
2. Nakashima, Y., Arihara, K., Sasaki, A., Ishikawa, S., Itoh, M. (2002). Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. — *Journal of Food Science*, 67. — P. 434–437.
3. Нестеренко, А.А. Биологическая ценность и безопасность сырокопченых колбас с предварительной обработкой электромагнитным полем низких частот стартовых культур и мясного сырья / А.А. Нестеренко, К.В. Акопян // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. — 2014. — № 05(099). — С. 312–315.
4. Lebert, I. Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units / I. Lebert, S. Leroy, P. Giammarmaro, A. Lebert, J.P. Chacornac, S. Bover-Cid, M.C. Vidal-carou, R. Talon // *Meat Science*. — 2007. — № 76. — P. 112–122.
5. Храмова, В.Н. Разработка мясных продуктов функционального назначения с использованием пребиотиков / В.А. Долгова, В. Н. Храмова, О. Ю. Проскура // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. — 2013. — Т. 1. — № 2–1. — С. 168–171.
6. Arihara K., Ota H., Itoh M., Kondo Y., Sameshima T., Yamana-ka H., et al (1998) *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science*. — 63. — P. 544–547.
7. Здрабова Е.М., Шалимова О.А., Чернуха И.М., Радченко М.В. «Способ экстракции и разделения саркоплазматических и миофибриллярных белков мяса на фракции методом одномерного электрофореза в полиакриламидном геле», патент РФ на изобретение № 2524546, от 5 июня 2014 г.
8. Chernukha I.M. The study of risk factor and consequences of alimentary atherosclerosis in Wistar rat. *Maso. Reznicke noviny* / I.M.Chernukha, L.V.Fedulova. — 2013. — 6. — P. 28–30.
9. Гиро, Т.М. Функциональные мясные продукты с добавлением тыквенного порошка / Т.М. Гиро, С.В. Давыдова // Мясная индустрия. — 2007. — № 10. — С. 43–44.

### 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

#### 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 07.03.2016

30 day period of feeding was observed in the experimental groups. Digestibility of air-dried meat proteins on the basis of *in vitro* digestibility by pepsin and trypsin was higher by 2.56 mg tyrosin / g protein in the samples with starter cultures that contained lactic acid bacteria *Staphylococcus carnosus* and *Lactobacillus plantarum*.

## REFERENCES

1. Levakhin V.I. The main directions and methods for increasing beef production effectiveness and improvement of its quality / V.I. Levakhin, I.F. Gorlov, V.V. Kalashnikov // *Herald of RASHN-VolgGTU*. — 2006. — P. 172–174.
2. Nakashima, Y., Arihara, K., Sasaki, A., Ishikawa, S., Itoh, M. (2002). Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. — *Journal of Food Science*, 67. — P. 434–437.
3. Nesterenko A.A. Biological value and safety of uncooked smoked sausages with preliminary treatment of starter cultures and meat raw material with low-frequency electromagnetic fields / A.A. Nesterenko, K.V. Akopyan // *Multitopic network electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University*. — 2014. — № 05 (099). — P. 312–315.
4. Lebert, I. Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units / I. Lebert, S. Leroy, P. Giammarmaro, A. Lebert, J.P. Chacornac, S. Bover-Cid, M.C. Vidal-carou, R. Talon // *Meat Science*. — 2007. — № 76. — P. 112–122.
5. Khramova V.N. Developing meat products of functional purpose using prebiotics / V.A. Dolgova, V.N. Khramova, O.Yu. Proskurina // *Proceedings of Nizhnevolskiy Agrouniversity Complex: Science and Higher Vocational Education-2013*. — Vol. 1. — № 2–1. — P. 168–171.
6. Arihara K., Ota H., Itoh M., Kondo Y., Sameshima T., Yamana-ka H., et al (1998) *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science*. — 63. — P. 544–547.
7. Zdrabova E.M., Shalimova O.A., Chernukha I.M., Radchenko M.V. A method for extraction and separation of sarcoplasmatic and myofibrillar meat proteins on fractions by the method of one-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel, Patent of the RF for invention № 2524546, of July 5, 2014.
8. Chernukha I.M. The study of risk factor and consequences of alimentary atherosclerosis in Wistar rat. *Maso. Reznicke noviny* / I.M.Chernukha, L.V.Fedulova. — 2013. — 6. — P. 28–30.
9. Giro, T.M. Functional meat products with addition of powdered pumpkin / T.M.Giro, S.V. Davidova // *Meat Industry*. — 2007. — № 10. — P. 43–44.

### AUTHOR INFORMATION

#### Affiliation

**Kovaleva Oksana Anatolyevna** — doctor of biological sciences, Director of the Innovation Scientific-Research Test Center, The Orel State Agrarian University named after N. V. Parakhin  
302019, Orel, Generala Rodina str., 69  
Tel.: +7-4862-47-51-71  
E-mail: iniic@mail.ru

**Zdrabova Catherine Mihailovna** — candidate of technical sciences, research scientist of the Innovation Scientific-Research Test Center, The Orel State Agrarian University named after N. V. Parakhin  
302019, Orel, Generala Rodina str., 69  
Tel.: +7-4862-47-51-71  
E-mail: iniic@mail.ru

#### Contribution

The 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 07.03.2016