

# ВЛИЯНИЕ СПОНТАННОЙ МИКРОФЛОРЫ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ КОНИНЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

Чернуха И.М.<sup>1</sup>, Никонов И.Н.<sup>2</sup>, Машенцева Н.Г.<sup>3</sup>,  
Клабукова Д.Л.<sup>4</sup>,\* Афанасьев Д.А.<sup>3</sup>, Ковалев Л.И.<sup>5</sup>, Ильина Л.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт прикладной биохимии и машиностроения «Биохиммаш», Москва, Россия

<sup>5</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук, Москва, Россия

**Ключевые слова:** пептиды, *Lactobacillus*, T-RFLP, одномерный электрофорез, двумерный электрофорез, протеомика, конина, мясные продукты

## Аннотация

В настоящее время для накопления в мясном сырье функциональных пептидов используют различные методы, в том числе включающие использование спонтанной микрофлоры в ходе автолиза, использование ферментов микробного происхождения (применение стартовых культур) и использование ферментов немикробного происхождения (ферменты животного и растительного происхождения). Каждый из методов имеет свои специфические особенности воздействия на сырье, что требует их детального изучения. В данной статье рассматривается влияние спонтанной микрофлоры ферментированных мясных продуктов из конины на образование биологически активных пептидов. С использованием T-RFLP-анализа установлено, что в составе микрофлоры сыровяленной и сырокопченой колбас, произведенных с использованием мышечной ткани конины в виде мясного сырья, значительная часть микрофлоры представлена молочнокислыми микроорганизмами. Так, наибольшее содержание молочнокислой микрофлоры наблюдается в образце № 1 (52,45%), а наименьшее — в образце № 3 (29,62%). В образце № 2 наблюдается среднее процентное содержание микрофлоры по сравнению с образцами № 1 и № 3 — 38,82%. Следует также отметить, что приблизительно 25% микрофлоры относится к некультивируемой, т.е. имеющей метаболические процессы, но не дающей роста на питательных средах. В образцах обнаружены представители актиномицетов и псевдомонад. Патогенной и условно-патогенной микрофлоры не обнаружено. Сравнительное протеомное исследование методом электрофореза трех видов колбас из конины, выработанных с использованием стартовых культур по различным технологиям, показало количественные и качественные различия по нескольким белковым фракциям. Наибольшее отличие в количестве белковых полос наблюдается между образцами № 1/№ 2 и № 3. Белковый профиль конины в образце № 3 имел значительное количественное отличие от белковых профилей образцов № 1 и № 2. Так, количественное содержание белковых полос в образце № 3 в диапазоне молекулярных масс 45–250 кДа всего 4, в то время как в образцах № 1 и № 2 их вдвое больше. В исследуемых образцах наблюдаются не только количественные, но и качественные изменения. Так, в образце № 1 и № 2 обнаружены фракции амило-1,6-глюкозидазы, миозин связывающего белка С быстрого типа, глюкозо-6-фосфат изомеразы, тропонина I быстрых скелетных мышц, фосфоглицераткиназы, пируваткиназы и скелетномышечного актина, отсутствующие или уменьшающиеся в образце № 3. Таким образом, в исследуемой продукции наблюдалась сохранность основного спектра мышечных белков, а идентифицированные фракции очевидно, могут быть источниками новых функциональных пептидов. По результатам тандемной масс-спектрометрии по полученным массам были идентифицированы природные короткие пептиды, которые присутствовали в анализируемых экстрактах. В основном все они относились к разным пептидам конского миоглобина. Также было идентифицировано несколько фрагментов, среди которых обнаруживались тропонин-Т скелетномышечный быстрого типа и мышечная креатинкиназа. Полученные материалы можно рассматривать как экспериментальную основу для направленного воздействия стартовых культур с возможностью прогнозирования белкового и пептидного состава готового продукта, в т.ч. с целью получения биологически активных пептидов в них.

**ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:** Чернуха И.М., Никонов И.Н., Машенцева Н.Г., Клабукова Д.Л., Афанасьев Д.А., Ковалев Л.И., Ильина Л.А. Влияние спонтанной микрофлоры ферментированных мясных продуктов из конины на образование биологически активных пептидов. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(4):4-18. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-4-19

**FOR CITATION:** Chernukha I.M., Nikonov I.N., Mashentseva N.G., Klabukova D.L., Afanasev D.A., Kovalyov L.I., Ilina L.A. An influence of spontaneous microflora of fermented horsemeat products on the formation of biologically active peptides. Theory and practice of meat processing. 2017;2(4):4-18. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-4-19

# AN INFLUENCE OF SPONTANEOUS MICROFLORA OF FERMENTED HORSEMEAT PRODUCTS ON THE FORMATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

Irina M. Chernukha<sup>1</sup>, Il'ya N. Nikonov<sup>2</sup>, Natal'ya G. Mashentseva<sup>3</sup>, Daria L. Klabukova<sup>4,\*</sup>,  
Dmitrii A. Afanasev<sup>3</sup>, Leonid I. Kovalyov<sup>5</sup>, Larisa A. Ilina<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> «BIOTROPH» Limited, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Moscow state university of food production, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institute of Applied Biochemistry and Mechanical Engineering «Biochimmash», Moscow, Russia

<sup>5</sup> Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**Key words:** peptides, *Lactobacillus*, T-RFLP, one-dimensional electrophoresis, two-dimensional electrophoresis, proteomics, horsemeat, meat products

## Abstract

At present, different methods are used to accumulate functional peptides in meat raw materials, including the use of spontaneous microflora during autolysis, the use of the microbial enzymes (the application of starter cultures) and the use of the non-microbial enzymes (enzymes of animals and plant origin). Each method has its own specific characteristics of an impact on raw materials, which requires their detail study. This paper examines an effect of spontaneous microflora of fermented meat products from horsemeat on formation of biologically active peptides. Using the T-RFLP analysis, it was established that in air dried and uncooked smoked sausages produced with the use of the muscle tissue of horsemeat as a raw material, a significant proportion of microflora was presented by lactic acid microorganisms. The highest content of lactic acid microflora was observed in sample 1 (52.45 %), and the least in sample 3 (29.62 %). Sample 2 had the medium percent content of microflora compared to samples 1 and 3 — 38.82 %. It is necessary to note that about 25 % of microflora was unculturable; i.e., it had metabolic processes but did not grow on culture media. In the samples, the representatives of Actinobacteria and Pseudomonadales were found. Pathogenic and conditionally pathogenic microflora was not detected. Not only quantitative but also qualitative changes were observed in the studied samples. For example, in samples 1 and 2, the fractions of amilo-1,6-glucosidase, fast-type muscle myosin-binding-protein C; glucose-6-phosphate isomerase; fast skeletal muscle troponin I, phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase and skeletal muscle actin were found, which were absent or reduced in sample 3. Therefore, in the studied product, good preservation of the main spectra of muscle proteins was observed, and the identified fractions, apparently, can be sources of new functional peptides. Not only quantitative but also qualitative changes were observed in the studied samples. For example, in samples 1 and 2, the C-terminal fragments of the myosin heavy chain were found, which were absent in sample 3. Also, the significant content of myoglobin was revealed in samples 2 and 3, and the myosin light chain was found in sample 1. Therefore, in the studied product, good preservation of muscle proteins myosin and myoglobin, which can be a source of new functional peptides, was observed. Based on the results of tandem mass-spectrometry, the proteins and natural short peptides present in the analyzed extracts were identified by the obtained masses. They belonged mainly to different peptides of equine myoglobin. Also, we identified several fragments, among which fast skeletal muscle troponin T and muscle creatine kinase were found. The obtained materials can be regarded as an experimental basis for the directed impact of starter cultures with a possibility to predict the protein and peptide composition of a finished product including with the aim of obtaining biologically active peptides.

## Введение

На сегодняшний день разработано множество стратегий по улучшению функциональной ценности мяса и мясных продуктов, которые могут быть реализованы путем добавления различных функциональных соединений, а также прижизненной модификацией животного сырья. В технологии мясных продуктов функционального и специализированного назначения успешно применяют модификацию состава (амино- и жирных кислот, контроля натрия хлорида), внесение функциональных элементов и специализированных модулей (растительных компонентов (масел, экстрактов, волокон), соевого белка, натуральных и синтетических антиоксидантов, молочнокислых бактерий, рыбьего жира, производных белков мяса — биологически активных пептидов).

Современная стратегия, направленная на увеличение продолжительности жизни за счет снижения риска хронических неинфекционных заболеваний, включает прогнозирование, превентивность или профилактику, персонализацию и партисипативность (принцип четырех «П») [1]. При этом научный прогноз об увеличении средней ожидаемой продолжительности жизни человека основан на многих направлениях, однако центральное место занимает создание средств эффективной и безопасной профилактики социально-значимых заболеваний. В России хронические неинфекционные заболевания являются причиной 75 % всех смертей. При этом на долю сердечно-сосудистых заболеваний приходится около 55 % [2].

В последние 10 лет во всем мире проводятся обширные исследования по изучению веществ белковой и пептидной природы, содержащихся в мясном сырье и готовых мясных продуктах [3,4]. Эти соединения образуются в процессе различной технологической обработки и обуславливают качественные и функциональные характеристики, а также безопасность готовых продуктов питания. Однако комплексное изучение механизмов их биосинтеза и деградации на молекулярном уровне практически не освещено. Стратегия изучения мясных белков как потенциальных источников биопептидов заключается в исследовании протеома на предмет наличия функциональных последовательностей и метаболитов, образованных в процессе автолиза, ферментации стартовыми культурами, а также гидролиза мясного сырья ферментами желудочно-кишечного тракта человека методами прикладной протеомики и биоинформатики [5,6].

Современные тенденции пищевой биотехнологии и биохимии мяса направлены на исследования по выявлению и идентификации белков и пептидов, характеризующих качественные характеристики во всех сырьевых источниках животного и растительного происхождения [7,8]. В настоящее время из мясного сырья, в особенности из мышечных белков говядины, курицы, свинины, выделено большое количество полипептидных веществ, содержащих примерно 2–30 аминокислот, нативно присутствующих в мясном сырье или образующихся в процессе технологической обработки. Выявлен ряд коротких пептидов, обладающих гипотензивным, опиоидным, антиоксидантным, антитромботическим и другими биологическими эффектами, которые оказывают влияние на ряд наиболее общих патогенетических механизмов, лежащих в основе развития патологических процессов [6,9,10]. Так в мясных белках содержатся аминокислотные последовательности, обладающие гипотензивными свойствами (куриный миозин, говяжий коллаген  $\alpha 1$ , свиной тропонин C), стимуляторы убиквитин-регулируемого протеолиза (куриный миозин, говяжий коллаген  $\alpha 1$ , свиной тропонин C), антиамнестической и антитромботической активностями (говяжий коллаген  $\alpha 1$ ), антибактериальными (куриный миозин), иммуномодулирующими (говяжий коллаген  $\alpha 1$ ) и опиоидными свойствами (говяжий коллаген  $\alpha 1$ , свиной тропонин C), ингибиторы дипептидилпептидазы IV (куриный миозин, говяжий коллаген  $\alpha 1$ , свиной тропонин C), а также регуляторы активности слизистой оболочки желудка (говяжий коллаген  $\alpha 1$ ). Так, в легкой цепи миозина имеются наборы аминокислотных последовательностей с противомикробными свойствами: коннектин богат пептидами с антитромботической, антиамнестической, опиоидной, нейропротекторной, иммуномодуляторной, антиоксидантной и гипотензивной активностями, а также ингибиторами дипептидилпептидазы IV

и регуляторами активности слизистой оболочки желудка. Говяжий, куриный и свиной актин несут последовательности-ингибиторы дипептидилпептидазы IV. Коллаген и эластин наиболее богаты последовательностями, несущими определенные корректирующие свойства за счет высокого содержания глицина и пролина. Так, в данных белках идентифицировано уже более 220 функциональных пептидов. Предположительно, гипополипидемический эффект обусловлен влиянием на экспрессию генов, отвечающих за липидный обмен. Было показано, что гидролизат свиного эластина снижает концентрацию общего холестерина и атерогенных классов липопротеинов в сыворотке крови крыс с моделью гиперхолестеринемии. Указанный эффект присваивается пептидам с низким соотношением метионин/глицин и лизин/аргинин, а также образованию лизиновых мостиков (десмозин и изодесмозин). Также было показано, что гидролизат свиной печени снижает уровень подкожного жира за счет подавления активности печеночных ферментов — участников липогенеза. Гидролизат коллагена куриных ножек оказывает благоприятный эффект при остеопорозе в периоде женской менопаузы, гидролизаты куриного мяса и костей способствуют лучшей колонизации кишечника бифидобактериями и могут быть использованы в качестве пребиотиков, коллагеновые гидролизаты стимулируют пролиферацию фибробластов, нейтрофилов и моноцитов, что является частью иммунокорректирующего действия [11,12].

Для накопления в мясном сырье функциональных пептидов используют различные методы, в том числе включающие автолиз или прямой гидролиз, а также ферментацию (с использованием спонтанной микрофлоры, стартовых культур или ферментов).

Некоторые исследования показали возможность производства различных биоактивных пептидов, включая антимикробные, иммуномодулирующие, антиокислительные и ингибирующие ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) посредством микробного протеолиза [13,14]. Так, несколько молочнокислых бактерий (например, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*) выделяют биоактивные пептиды в процессе ферментации. Эта система состоит из ряда различных внутриклеточных пептидаз, включая эндопептидазы, аминокислотные пептидазы, дипептидазы и трипептидазы [15, 16].

Отмечено, что геном лактобацилл кодирует большее количество протеаз, пептидаз, аминокислотных пермеаз и олигопептидных транспортных систем, чем лактококки [17]. Например, олигопептидная транспортная система *L. lactis* транспортирует пептиды до по меньшей мере 18 остатков [18].

Однако протеолитические ферменты, высвобождаемые молочнокислыми бактериями, оказались очень разными в разных их видах и штаммах, что привело к возникновению разных групп биоактивных пептидов [19,20].

*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4 обладают способностью модулировать кровяное давление, производя ангиотензин 1-конвертирующий фермент, ингибирующий пептиды (ингибиторы АПФ) из молочных белков [21].

В большинстве исследований биоактивных веществ из источников мяса основное внимание уделялось именно ингибирующим АПФ и антиоксидантным пептидам. В ферментированных мясных продуктах особое внимание уделяется контролю биогенных аминов: тирамина, кадаверина, путресцина и гистамина. Некачественная обработка, благоприятствующая загрязнению, является основной причиной слишком высокого содержания биоамин в мясе, однако в литературе были описаны также стартовые штаммы, обладающие способностью синтезировать биогенные амины, такие как *Lactobacillus curvatus* [22]. Чтобы предотвратить такой риск, следует учитывать селекцию отдельных стартовых культур, обладающих активностью аминоксидазы или способностью к синтезу бактериоцинов, с целью нивелировать нежелательные последствия спонтанных ферментаций.

В данной статье рассматривается влияние спонтанной микрофлоры ферментированных мясных продуктов из конины на образование биологически активных пептидов.

### Материалы и методы

На первом этапе методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism — полиморфизм длин терминальных рестрикционных фрагментов) был проведен анализ микрофлоры 3 мясных продуктов из конины естественной ферментации:

- национального ферментированного мясного продукта «Казы», произведенного в Пензенской области. В состав «Казы» входят конина и конский жир с добавлением соли, сахара и чеснока. Конина получена от животных, содержащихся на пастбищном выращивании, партия 1 и 2 (соответственно образцы № 1 и 2);
- сырокопченого мясного продукта «Балык» из конины, произведенного по ТУ 9213-028-54780900-2011 на предприятии Московской области. В состав балыка входят конина, нитритно-посолочная смесь, чеснок, пряности, сахар, аскорбат натрия (образец № 3).

Для анализа микрофлоры продукта через 5 дней с момента изготовления в стерильных условиях были взяты 3 навески из внутренней части колбасы в количестве 1 г, из которых была приготовлена средняя проба гомогенизацией проб в керамической ступке. ДНК из пробы выделяли экстракцией фенолом/хлороформом в соотношении 1:1 и очисткой раствором СТАВ.

Для выделения ДНК 0,5 г средней пробы помещали в эппендорф (1,5 мл) с завинчивающейся крышкой. К пробе добавляли 500 мкл буфера I (СТАВ 2 %;

Tris-HCl 0,1 М; ЭДТА-Na<sub>2</sub> 20 мМ; NaCl 1,4 М; pH 8,5) и 0,5 г стеклянных шариков (Хеликон, Россия). Пробу прогревали в течение 15 мин при 65 °С и гомогенизировали в течение 15 мин на персональном вортексе V-1 plus (Biosan, Латвия) при 3000 оборотов, затем повторяли прогревание в течение 15 мин. Далее пробу экстрагировали в течение 10 мин при 14000 оборотов в центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) 400 мкл смесью фенол/хлороформ (1:1), затем 400 мкл хлороформа, отбирая каждый раз супернатант в новый эппендорф объемом 1,5 мл. После этого в центрифуге при 14000 оборотов осаждали ДНК 400 мкл 96 % спирта в присутствии раствора натрия ацетата до конечной концентрации 0,3 М (Хеликон, Россия) и растворяли в 100 мкл буфера TE (Tris-HCl 10 мМ; ЭДТА-Na<sub>2</sub> 1 мМ) (Хеликон, Россия).

ПЦР-амплификацию генов 16S рРНК бактерий проводили с использованием праймеров 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) с меткой на 5'-конце (флуорофор D4-WellRed) и 1492R (TACGGHTACCTTGTTACGACTT). Смесь для ПЦР включала 10 пМ праймеров, 2,5 ед. Taq-полимеразы (Fermentas, США), X10 буфер для Taq-полимеразы (Fermentas, США), 2 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, США); смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ — до конечной концентрации 150 мкМ), 1 мкл ДНК, деионизированной водой доводили пробу до объема 20 мкл. ПЦР проводили в амплификаторе МахуGene (Axygen, США) при условиях: 95 °С — 3 мин, 35 циклов (95 °С — 30 сек, 55 °С — 30 сек, 72 °С — 60 сек), 72 °С — 10 мин.

Амплифицированный фрагмент выделяли из агарозного геля с помощью 3М раствора гуанидина тиоционата. Для этого из агарозного геля вырезали агарозный блок с амплифицированным фрагментом ДНК и помещали в эппендорф объемом 1,5 мл. К блоку добавляли 100 мкл раствора А (3 М гуанидин-изотиоцианат, 20 мМ EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 40 мг/мл TritonX-100) (Хеликон, Россия), нагревали до 65 °С до полного растворения блока агарозы. Далее пробу перемешивали, добавляли 20 мкл раствора В (1000 мкл раствора А, 40 мг/мл ДНК-сорбента Silica) (Хеликон, Россия) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Далее осаждали амплификат с сорбентом в центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) при 4000 об/мин в течение 1 мин и полностью отбирали раствор. Аналогичным образом промывали осадок силики с ДНК со 100 мкл растворов А, С (25 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 25 % изопропанол, 100 мМ NaCl, 10 мМ TRIS-HCl, pH 8,0) (Хеликон, Россия) и 70 % спиртом. После этого осадок высушивали и элюировали ДНК в 100 мкл раствора 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0) (Хеликон, Россия) в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее раствор центрифугировали 3 мин при 14000 об/мин и отбирали в новые пробирки очищенный препарат ДНК.

Рестриктию ампликонов проводили с помощью рестриктаз HaeIII, HhaI и MspI (Fermentas, США) в течение 2 ч при 37°C. Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл: 10 ед. рестриктазы, 1,5 мкл буфера для рестрикции и до 15 мкл деионизированной воды. После окончания рестрикции ДНК из реакционной смеси осаждали этанолом в количестве 38 мкл в присутствии 1,5 мкл 3М раствора ацетата натрия, далее растворяли в 10 мкл SLS (Beckman Coulter, США) с добавлением 0,2 мкл маркера молекулярного веса 600 п.н. (Beckman Coulter, США) и разделяли в условиях капиллярного электрофореза (программа Frag4) с флуоресцентной детекцией с использованием автоматического секвенатора CEQ8000 (Beckman Coulter, США).

Вычисление размеров пиков и их площади проводили с использованием программного блока FragmentAnalysis (BeckmanCoulter, США). Погрешность определения площади пиков при T-RFLP-анализе составляет не более 5%. Для идентификации пиков T-RFLP-граммы для трех эндонуклеаз (*HaeIII*, *HhaI* и *MspI*) обрабатывали с помощью программы FragmentSorter (<http://www.oardc.ohio-state.edu/trflpfragsort/index.php>).

Вторым этапом работы было проведение анализа фракционного состава белков исследуемых образцов методом одномерного электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в камере «VE-10» (Хеликон, Россия) при постоянном напряжении 60 В. По достижении фронта разделяющего геля увеличивали напряжение до 130 В и продолжали разделение в течение 2–2,5 ч [23]. Количество внесенного белка в гель составляло 20 мкг для всех образцов. Концентрацию белка в пробах определяли биуретовым методом на фотометре BioChem SA (НТИ, США). В качестве стандарта для электрофореза использовали маркер фирмы «Thermo», США, представляющий собой смесь 11 рекомбинантных белков (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 и 5 кДа). Окрашивание проводили с использованием красителя Кумасси G-250. Белковый состав анализировали с помощью базы данных UniProtProteinData-Base (<http://www.uniprot.org/>) [25].

Идентификацию белковых фракций на ДЭ осуществляли после трипсинолиза [26] методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker, Германия) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да с калибровкой их по известным пикам автолиза трипсина. Анализ полученных масс-спектров триптических пептидов выполняли с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (Matrix Science, США), с точностью определения массы МН<sup>+</sup>, равной 0,01 %, осуществляя поиск по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Математическую и статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

### Результаты и обсуждение

При анализе образцов конской колбасы методом T-RFLP установлено следующее соотношение микрофлоры, что показано в Табл. 1.

Большая часть микрофлоры колбасы — 52,45 % у образца № 1, 38,82 % у образца № 2 и 29,62 % у образца № 3 — представлена молочнокислыми микроорганизмами. Высокое содержание лактобактерий в образцах 1 и 2, по-видимому, обусловлено спонтанным протеканием процесса ферментации и отсутствием таких консервирующих агентов как нитрит и аскорбат натрия.

На некультивируемые микроорганизмы приходится приблизительно одна четвертая часть микрофлоры — 24,1 % у образца № 1, 22,01 % у образца № 2 и 25,17 % у образца № 3. Некультивируемые формы бактерий имеют метаболическую активность, но не растут на питательных средах. Переход в некультивируемую форму происходит при воздействии неблагоприятных факторов, однако при попадании в организм человека они могут рекультивироваться — оживать, что объясняет наличие природно-очаговых заболеваний. Поэтому информация об их присутствии в составе мясных продуктов является важной для оценки безопасности и качества продукции.

Помимо этого обнаружены актиномицеты *Microbacterium*, псевдомонады, *Burkholderia* sp., в т.ч. *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp. и *Flavobacterium* spp.

Патогенных микроорганизмов и бактерий группы кишечных палочек выявлено не было.

Результаты проведенных электрофоретических исследований показали отличия между исследуемыми образцами, электрофореграммы которых изображены на Рис. 1.

При анализе результатов фракционирования белков исследованных образцов выявлено, что образцы № 1 и № 2 схожи по белковому профилю и имеют лишь незначительные отличия (в сторону уменьшения у образца № 2) в количестве в зоне белков 38–42, 23 и 15 кДа при окрашивании СВВ R-250, который дает большую линейность связывания с белком. Образец № 3 явно отличался от них, что объясняется различием их составов и технологий производства. В нем содержится меньше белковых фракций, а некоторые исчезали практически полностью. Окрашивание более чувствительным методом (азотнокислым серебром) подтвердило выявленные изменения и позволило детектировать ряд других меняющихся в количестве фракций, представленных в минорном количестве.

Таблица 1. Состав бактериального сообщества конской колбасы, %

Микроорганизм	Образец		
	№ 1	№ 2	№ 3
Бактероиды	0	5,31 <i>Bacteroidetes</i>	20,06 <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Prevotella</i> sp.
Лактобактерии	52,45 <i>Lactobacillus</i> sp.	38,82 <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Lactobacillus manihotivorans</i>	29,62 <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus garvieae</i>
Бациллы	13,47 <i>Bacillus</i> sp., <i>Alicyclobacillus</i> sp.	7,73 <i>Alicyclobacillus</i> sp.	3,08 <i>Brevibacillus levickii</i> , <i>Saccharococcus thermophilus</i> , <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> , <i>Paenibacillus</i> sp.
Бифидобактерии	0	0	0,77 <i>Bifidobacterium</i> sp.
Пропионибактерии	0	0	0,82 <i>Propionibacterium</i> sp.
Псевдомонады	0	0,26 <i>Pseudomonas</i> sp.	4,69 <i>Pseudomonas</i> sp.
Буркхолдерии	0	0	3,12 <i>Burkholderia</i> sp.
Протеобактерии	2,41 <i>Lysobacter</i> sp., <i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	13,83 <i>Sphingomonas</i> , <i>Lysobacter</i> sp., <i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	0,67 <i>Lysobacter</i> sp., <i>Brenneria quercina</i> , <i>Alteromonadaceae</i>
Ацидобактерии	0	2,33 <i>Acidobacterium</i> sp.	0
Бутиривибрио	0	0,5 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0
Эубактерии	0	0,74 <i>Eubacterium</i> sp.	0
Клостридии	0	0	0,58 <i>Clostridium innocuum</i>
Термоанаэробактерии	0	2,07 <i>Thermoanaerobacter cellulolyticus</i> , <i>Caldicellulosiruptor kronotskiensis</i>	0
Сукциникластикум	0	0	0,65 <i>Succiniclasticum ruminis</i>
Аркобактер	0	0,33 <i>Arcobacter</i> sp.	0
Энтеробактерии	0	0	0,14 <i>Brenneria quercina</i>
Актиномицеты	6,02 <i>Streptomyces</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp.	6,07 <i>Micromonospora</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Kocuria</i> sp.	9,28 <i>Streptomyces</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Saccharomonosporaglauca</i> , <i>Micromonospora</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Amycolatopsis</i> sp., <i>Catellatospora</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium bovis</i>
Пептококки	1,55 <i>Desulfotomaculum</i> sp.	0	1,35 <i>Desulfotomaculum</i> sp., <i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>
Некультивируемые бактерии	24,1	22,01	25,17

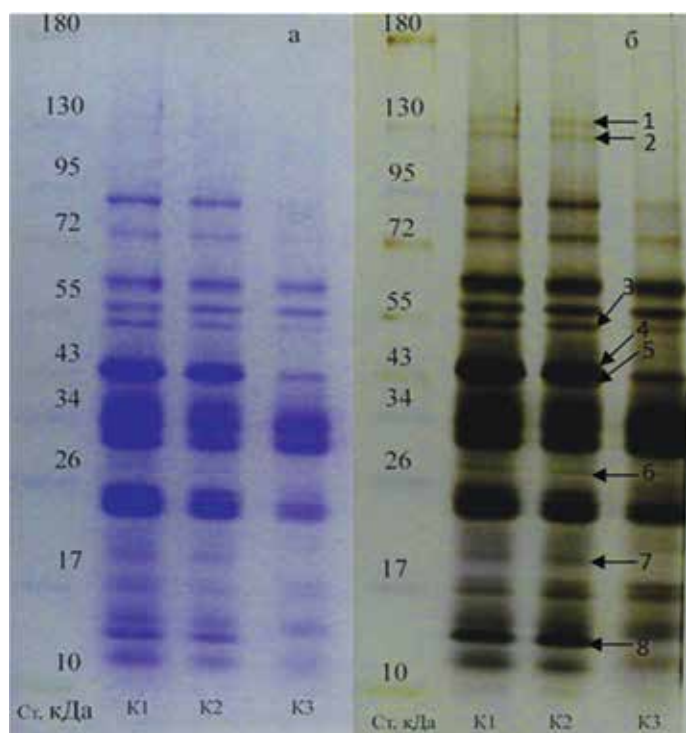


Рис. 1. Одномерный SDS электрофорез образцов мясных продуктов. Ст — смесь стандартных белков, K1 — образец № 1, K2 — образец № 2, K3 — образец № 3. Левая колонка (а) — окраска СВВ R-250, правая (б) — азотнокислым серебром

К ним относились фракции с молекулярной массой 132, 128, 75, 90, 53, 45, 36, 28, 20 и 16 кДа. Белки этих фракций и являются основными компонентами, генерирующими короткие пептиды. Восемь из

них были идентифицированы времяпролетной масс-спектрометрией.

Так, в образцах № 1 и № 2 обнаружены фракции амило-1,6-глюкозидазы, миозин связывающего белка С быстрого типа, глюкозо-6-фосфат изомеразы, тропонина I быстрых скелетных мышц, фосфоглицераткиназы, пируваткиназы и скелетномышечного актина, отсутствующие или уменьшающиеся в образце № 3. Результаты идентификации представлены в Табл. 2.

С учетом результатов тандемной масс-спектрометрии по полученным массам были идентифицированы белки, природные короткие пептиды которых присутствовали в анализируемых экстрактах. В основном все они относились к разным пептидам конского миоглобина (Табл. 3).

Образцы № 1 и 2 сходны по спектрам, что объясняется сходством их состава и условий протекания процесса ферментации, в них присутствовали идентичные пики масс, а в образце № 3 имелись более выраженные различия. Набор одинаковых пептидов миоглобина первых двух образцов отсутствовал в образце № 3, но выявлялся свой пептид, при наличии во всех трех образцах пептида тропонина Т. Кроме этого, были определены протяженные последовательности трех неизвестных белков. При анализе в ручном режиме удалось выяснить, что пептид с  $m/z$  2000.9168 является пептидом 14–28 аминокислотной последовательности М-креатинкиназы мышечного типа, данный пик есть во всех видах исследованных колбас.

Таблица 2. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOFMS и MS / MS) белковых фракций, отличающихся по количеству в исследованных образцах

№	Наименование белка; некоторые синонимы, (символ гена)	Номера в Protein NCBI	S / M / C*	Мм, кДа (эксп.)**	Мм, кДа (расчет.)**
1	Фрагмент 43–1221 а.п. амило-1,6-глюкозидазы; glycogen debranching enzyme (AGL)	NP 001103778.1	163/22/18	132,0	174,6
2	Миозин связывающий белок С быстрого типа; myosin-binding protein C, fast-type (MYBPC2)***(1)	XP 005596801.1	117/9/15	128,0	115,1
3	Глюкозо-6-фосфат изомераза; glucose-6-phosphate isomerase (GPI)***(2) + Acetyl (Protein N-term)	XP 001490657.2	79/15/27	53,0	62,7
4	Гомолог фосфоглицераткиназы 1; phosphoglycerate kinase 1 [Equus przewalskii] (PGK1)***(1)	XP 008508104.1	75/25/61	43,1	45,0
5	Смесь изоформы M1 пируваткиназы; pyruvate kinase PKM isoform M1 (PKM) и гомолога скелетномышечного актина; actin, alpha skeletal muscle [Equus przewalskii] (ACTA1)	NP 00115316.1 XP 008531873.1	81/15/35 98/17/41	42,5	43,0 43,1
6	Смесь фрагмента 88–331 а.п. альдолазы А; fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)***(1) и фрагмента 21–316 гомолога скелетномышечного актина; actin, alpha skeletal muscle [Equus przewalskii] (ACTA1)***(2)	XP 003362760 XP 008531873.1	107/7/29 42/29/61	28,0	39,4 43,1
7	Гомолог фрагмента 20–163 а.п. тропонина I быстрых скелетных мышц; troponin I, fast skeletal muscle (TNNI2) [Equus asinus]***(2)	XP 014685731.1	244/20/59	19,0	21,4
8	Миоглобин; Myoglobin (MB)***(1)	NP 001157488.1	96/12/76	16,0	17,1

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

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

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

Таблица 3. Результаты тандемной масс-спектрометрии коротких пептидов в экстрактах колбас

Название белка	m/z, аминокислотная последовательность пептида и номера позиций в белке		
	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3
Миоглобин	(1239.6175) SKHPGDFGADA (115–125)	–	–
Миоглобин	(1424.7059) SKHPGDFGADAQG (115–127)	–	–
Миоглобин	–	–	(2504.3236) KKKGNHEAELKP- LAQSHATENK (77–98)
Миоглобин	(2571.3249) GNHEAELKPLAQ- SHATENKIPIK (80–102)	+	–
Миоглобин	(2844.4926) GGILKKGHNHEA- ELKPLAQSHATENK(73–98)	+	–
Миоглобин	(2955.5830) KKKGNHEAELKP- LAQSHATENKIPIK(77–102)	+	–
Неизвестный	(2000.9168) YKPEEEYPDI/LSKHNN (14–28)	+	+
Неизвестный	(1711.8415) VWGKVEADI/ LAGHGQ	+	–
Неизвестный	–	–	(1858.9383) KI/LDESAKMEAE TKI/LH
Тропонин Т, изоформа быстрого скелетно-мышечного типа (2–22)	+	+	(2637.9358) SDEEVENVEEEYEEEEEAQEE (2–22)

### Выводы

При анализе микрофлоры трех мясных продуктов из конины естественной ферментации — сыровяленной колбасы «Казы» и сырокопченой «Балык» — методом T-RFLP установлено, что во всех образцах молочнокислые микроорганизмы преобладали над прочими группами микроорганизмов. При этом некультивируемые микроорганизмы составляли одну четвертую часть всей микрофлоры продуктов. Были обнаружены также актиномицеты *Microbacterium*, псевдомонады, *Burkholderia* sp., относящиеся к условно-патогенным микроорганизмам, и бактерии *Pseudomonas* spp. и *Flavobacterium* spp., которые могут вызывать порчу мяса и мясных продуктов. Патогенных микроорганизмов в образцах выявлено не было.

Исследование данных продуктов методом одномерного электрофореза, показало различия в белковом профиле. В образце колбасы «Балык» содержалось меньше белковых фрагментов, чем в образцах «Казы».

Проведенное сравнительное протеомное исследование трех видов колбас показало количественные различия по нескольким фракциям. С учетом результатов тандемной масс-спектрометрии идентифицированы белки, природные короткие пептиды которых

присутствовали в анализируемых образцах. В основном они относились к разным пептидам конского миоглобина.

В целом в исследуемой продукции наблюдалась хорошая сохранность мышечных белков миозина и миоглобина, которые, очевидно, могут быть источниками функциональных пептидов. Различия в белковых профилях продуктов, по-видимому, обусловлены технологическими особенностями изготовления и спонтанным течением процесса ферментации.

Такими образом, спонтанная микрофлора ферментированных мясных продуктов, особенно при преобладании молочнокислых микроорганизмов, способна влиять на образование биологически активных пептидов мяса, что подтверждается исследованиями, результаты которых приведены в данной статье. Кроме того, предложенный подход и алгоритм поиска можно использовать для поиска и идентификации коротких природных пептидов в образцах колбас.

### Выражение признательности (Acknowledgments)

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

### Introduction

At present, many strategies were developed to improve the functional value of meat and meat products, which can be realized by addition of different functional compounds and well as by ante mortem modification of animal raw materials. The technology of functional and specialized

products successfully uses the modification of the composition (amino- and fatty acids, control of sodium chloride), incorporation of functional elements and specialized modules (plant components (oils, extracts, fibers), soy protein, natural and synthetic antioxidants, lactic acid bacteria, fish oil and meat protein derivatives (biologically active peptides).



The modern strategy directed towards an increase in longevity due to a decrease in the risk of chronic noncommunicable diseases includes prediction, prevention, personalization and participativity (the principle of P4 medicine) [1]. With that, the scientific forecast about an increase in an average life expectancy of humans is based on many directions; however, the central place is occupied by the development of effective and safe prophylaxis of socially significant diseases. In Russia, chronic noncommunicable diseases are a cause of 75 % of all deaths. With that, the cardiovascular diseases account for about 55 % [2].

Over the last 10 years, extended studies on the substances of the protein and peptide nature in meat raw materials and finished meat products [3, 4] have been carried out. These compounds are formed in the process of different technological processing and stipulate quality and functional characteristics as well as safety of foods. However, the complex investigations on the mechanisms of their biosynthesis and degradation at the molecular level are practically not highlighted. The strategy for studying meat proteins as potential sources of biopeptides consists in investigation of proteome regarding the presence of functional sequences and metabolites formed during the autolysis process, fermentation by starter cultures as well as hydrolysis of meat raw materials with the human gastrointestinal enzymes using the methods of applied proteomics and bioinformatics [5,6].

The current trends in food biotechnology and meat biochemistry are directed towards investigations regarding detection and identification of proteins and peptides characterizing quality characteristics in all raw material sources of animal and plant origin [7,8]. At present, a great number of polypeptide substances containing about 2–30 amino acids, which exist initially in meat raw material or were formed during technological processing, have been extracted from meat raw materials, especially from beef, chicken and pork muscle proteins. A range of short peptides was revealed, which had hypotensive, opioid, antioxidant, antithrombotic and other biological effects that influenced a range of the most general pathogenetic mechanisms underlying the development of pathological processes [6,9,10]. For example, meat proteins contain amino acid sequences with the hypotensive activity (chicken myosin, beef collagen  $\alpha 1$  and pork troponin C), stimulators of the ubiquitin-mediated proteolysis (chicken myosin, beef collagen  $\alpha 1$  and pork troponin C), anti-amnesic and antithrombotic activities (beef collagen  $\alpha 1$ ), antibacterial (chicken myosin), immunomodulatory (beef collagen  $\alpha 1$ ) and opioid properties (beef collagen  $\alpha 1$ , pork troponin C), inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (chicken myosin, beef collagen  $\alpha 1$ , pork troponin C), as well as regulators of the activity of the gastric mucosa (beef collagen  $\alpha 1$ ). For example, myosin light chain has the sets of the amino acid sequences with the antimicrobial properties: connectin is rich in the peptides with the antithrombotic, anti-amnesic, opioid, neuroprotective, immunomodulatory, antioxidant and hypotensive activities, as well as inhibitors of dipeptidyl

peptidase IV and regulators of the activity of the gastric mucosa. Beef, chicken and pork actin carry the sequences — inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Collagen and elastin are the richest in the sequences having specific corrective properties due to the high content of glycine and proline. More than 220 functional peptides have been already identified in the above mentioned proteins. Presumably, the hypolipidemic effect is conditioned by an influence on expression of the genes responsible for lipid metabolism. It was shown that the pork elastin hydrolysate reduces the concentration of total cholesterol and atherogenic lipoprotein classes in blood serum of the rats with a model of hypercholesterolemia. This effect is assigned to peptides with the low ratio of methionine/glycine and lysine/arginine, as well as formation of lysine bridges (desmosin and isodesmosin). In addition, it was demonstrated that the pork liver hydrolysate reduced the subcutaneous fat level due to suppression of the activity of liver enzymes — participants of lipogenesis. The chicken leg collagen hydrolysate has a positive effect in osteoporosis during menopause, chicken meat and bone hydrolysates facilitate better gut colonization with bifidobacteria and can be used as prebiotics; collagen hydrolysates stimulate proliferation of fibroblasts, neutrophils and monocytes, which is a part of immunocorrective action [11,12].

A number of methods are used for accumulation of functional peptides in raw meat including autolysis or direct hydrolysis, as well as fermentation (using spontaneous microflora, starter cultures or enzymes).

Several studies showed a possibility to produce different bioactive peptides, including the antimicrobial, immunomodulatory, antioxidant and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activities by microbial proteolysis [13,14]. For example, several lactic acid bacteria (such as, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*) produce bioactive peptides during fermentation. This system consists in a range of different intracellular peptidases, including endo-peptidases, amino-peptidases, di-peptidases and tri-peptidases [15,16].

It is noted that genome of lactobacilli codes more proteases, peptidases, amino acid permeases and oligopeptide transport systems than lactococcus [17]. For example, the oligopeptide transport system of *L. lactis* transports peptides, at least, up to 18 residues [18].

However, proteolytic enzymes released by lactic acid bacteria were very different in different species and strains, which led to emergence of different groups of bioactive peptides [19,20].

*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4 have an ability to produce angiotensin I-converting enzyme (ACE), which can modulate blood pressure [21].

In the majority of studies of bioactive substances from meat sources, the main attention was paid precisely to ACE inhibitory and antioxidant peptides. In fermented meat products a special attention is paid to the control

of biogenic amines: tyramine, cadaverine, putrescine and histamine. Improper processing that favors contamination is a main cause of too high content of bioamine in meat; however, the literature also describes starter cultures that have an ability to synthesize biogenic amines, such as *Lactobacillus curvatus* [22]. To prevent this risk, it is necessary to take into consideration selection of individual starter cultures having the aminooxidase activity and capable of bacteriocine synthesis with the aim of leveling undesirable effects of spontaneous fermentation.

This paper examines an effect of spontaneous microflora of the fermented meat products from horsemeat on the development of the biologically active peptides.

### Materials and methods

At the first stage, an analysis of microflora by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) was carried out in three naturally fermented meat products from horsemeat:

- the national fermented product «Kazi» produced in Penzenskaya oblast. The composition of the product includes horsemeat and horse fat with addition of salt, sugar and garlic. Horsemeat was obtained from animals raised on pastures (lots 1 and 2; samples 1 and 2, respectively);
- the uncooked smoked meat product «Balyk» from horsemeat produced by TS9213–028–54780900–2011 in an enterprise in the Moscow district. The composition of «Balyk» includes horsemeat, the nitrite-curing mixture, garlic, spices, sugar, sodium ascorbate (sample 3).

For analysis of the product microflora, 3 samples of 1 g were taken from the inner part of the sausage in the sterile conditions 5 days after preparation. From these specimens, an average specimen was prepared by homogenization in a ceramic mortar. The DNA was recovered from the specimen by extraction with phenol/chloroform in a ratio of 1:1 and purification with the CTAB solution.

For DNA recovery, 0.5 g of the average specimen was transferred into an Eppendorf 1.5 ml tube with a screw cap. 500 µl of buffer I (CTAB2%; Tris-HCl 0.1M; EDTA-Na<sub>2</sub> 20 mM; NaCl 1.4 M; pH 8.5) and 0.5 g of glass beads (Helicon, Russia) were added to the specimen. The specimen was heated at 65 °C for 15 min. and homogenized on a personal Vortex V-1 plus (Biosan, Latvia) at 3000 rpm for 15 min.; then, the heating process was repeated during 15 min. After that, the specimen was extracted at 14000 rpm for 10 min. in the centrifuge Mini Spin (Eppendorf, Germany) with 400 µl of phenol/chloroform mixture (1:1), then 400 µl of chloroform, each time transferring the supernatant into new Eppendorf 1.5 ml tubes. After that, DNA was settled in a centrifuge at 14000 rpm with 400 µl of 96% ethanol in the presence of the sodium acetate solution to the final concentration of 0.3 M (Helicon, Russia) and dissolved in 100 µl of TE buffer (Tris-HCl 10 mM; EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM) (Helicon, Russia).

PCR amplification of the 16S rRNA genes of bacteria was carried out using the primers 63F (CAGGCCTAA-

CACATGCAAGTC) with a tag at the 5'-end (fluorophore D4-WellRed) and 1492R (TACGGHTACCTTGT-TACGACTT). The mixture for PCR contained 10 pM of primers, 2.5 units of *Taq* polymerase (Fermentas, USA), X10 buffer for *Taq* polymerase (Fermentas, USA), 2 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, USA); a mixture of deoxynucleotide triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP to the final concentration of 150 µM), 1 µl of DNA; a sample was brought to a volume of 20 µl with deionized water. PCR was performed in the amplifier MaxyGene (Axygen, USA) under the following conditions: 95 °C — 3 min, 35 cycles (95 °C — 30 s, 55 °C — 30 s, 72 °C — 60 s), 72 °C — 10 min.

The amplified fragment was isolated from the agarose gel using the 3M guanidine thiocyanate solution. To this end, an agarose block with the amplified DNA fragment was cut from the agarose gel and put into Eppendorf 1.5 ml tubes. 100 µl of solution A (3M guanidine isothiocyanate, 20 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40 mg/ml of TritonX-100) (Helicon, Russia) was added to the block and heated to 65 °C until full dissolution of the agarose block. Then, the sample was mixed, 20 µl of solution B (1000 µl of solution A, 40 mg/ml of DNA sorbent Silica) (Helicon, Russia) were added and incubated at the room temperature for 10 min. with intermittent mixing. After that, the amplicon was settled with a sorbent in the centrifuge Mini Spin (Eppendorf, Germany) at 4000 rpm for 1 min. and the solution was fully removed. Similarly, the sediment of silica with DNA was washed with 100 µl of solution A, C (25% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 25% isopropanol, 100 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl, pH 8.0) (Helicon, Russia) and 70% ethanol. After that, the sediment was dried and the DNA was eluted in 100 µl of 10 mM Tris-HCl solution (pH 8.0) (Helicon, Russia) for 15 min at the room temperature. Then, the solution was centrifuged at 14000 rpm for 3 min. and the purified DNA preparation was transferred into new tubes.

Restriction of amplicons was carried out with restriction enzymes *Hae*III, *Hha*I and *Msp*I (Fermentas, USA) at 37 °C for 2 hours. The total volume of the reaction mixture was 15 µl: 10 units of the restriction enzyme, 1.5 µl of buffer for restriction and up to 15 µl of deionized water. On completing restriction, DNA in the reaction mixture was settled with ethanol in an amount of 38 µl in the presence of 1.5 µl of 3M sodium acetate solution, then dissolved in 10 µl of SLS (BeckmanCoulter, USA) with addition of 0.2 µl of marker with the molecular weight of 600 bp (Beckman-Coulter, USA) and separated in the conditions of capillary electrophoresis (Frag4 program) with fluorescence detection using the automated sequencer CEQ8000 (Beckman-Coulter, USA).

Calculation of peak sizes and their areas was carried out using the Fragment Analysis software (Beckman Coulter, USA). The error of detection of peak areas at T-RFLP analysis is not more than 5%. For identification of peaks, the T-RFLP patterns for three endonucleases (*Hae*III, *Hha*I

and *MspI*) were processed using Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohio-state.edu/trflpfragsort/index.php>).

The second stage of the work was analysis of the protein fractional composition in the studied samples by one-dimensional electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) in a chamber VE-10 (Helicon, Russia) at a constant voltage of 60V. Upon reaching the front of the separating gel, the voltage was increased up to 130V and separation was continued for 2–2.5 hours [23]. An amount of protein introduced into the gel was 20 µg for all samples. The protein concentration in the samples was detected by the biuret method using a spectrophotometer Bio-Chem SA (HTI, USA). As a standard for electrophoresis, we used a marker from Thermo, USA, which is a mixture of 11 recombinant proteins (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 and 5 kDa). Staining was performed using Coomassie G-250. The protein composition was analyzed using the UniProt Protein Database (<http://www.uniprot.org/>) [25].

Identification of protein fractions on two-dimensional electrophoregrams (2DE) was performed after tryptic proteolysis [26] by MALDI-TOF MS and MS/MS mass-spectrometry using a MALDI-TOF mass-spectrometer Ultraflex («Bruker», Germany) with an UV-laser (336 nm) in the positive ion mode and a mass range of 500–8000 Da with their calibration according to the known trypsin autolysis peaks.

The obtained mass-spectra of tryptic peptides were analyzed by the Mascot software, Peptide Fingerprint option (Matrix Science, USA) with accuracy of MH+ mass detection of 0.01%, with the use of the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Mathematical and statistical processing of the results was carried out using Microsoft Excel 2010.

## Results and discussion

When analyzing the samples of horsemeat sausage by T-RFLP, the following ratio of microflora was established (Table 1).

Large part of sausage microflora (52.45% in sample 1, 38.82% in sample 2 and 29.62% in sample 3) was presented by lactic acid microorganisms. The high content of *Lactobacillales* in samples 1 and 2 was apparently conditioned by the spontaneous process of fermentation and an absence of preserving agents such as sodium nitrite and ascorbate.

The unculturable microorganisms accounted for about a quarter of microflora: 24.1% in sample 1; 22.01% in sample 2 and 25.17% in sample 3.

The unculturable forms of bacteria have the metabolic activity but do not grow on culture media. The transition to the unculturable form occurs at an exposure to unfavorable factors; however, when entering the human body, they can be re-cultivated (revived), which explains a presence of natural focal diseases. Therefore, information about their

presence in meat products is important for assessment of product safety and quality.

In addition, several other microorganisms were detected such as *Microbacterium*, *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., including *Burkholderia cepacia*, and *Flavobacterium* spp.

Pathogenic microorganisms and coliforms were not revealed.

The results of the performed electrophoretic investigations showed the differences between the studied samples, which electrophoregrams are presented in Fig. 1.

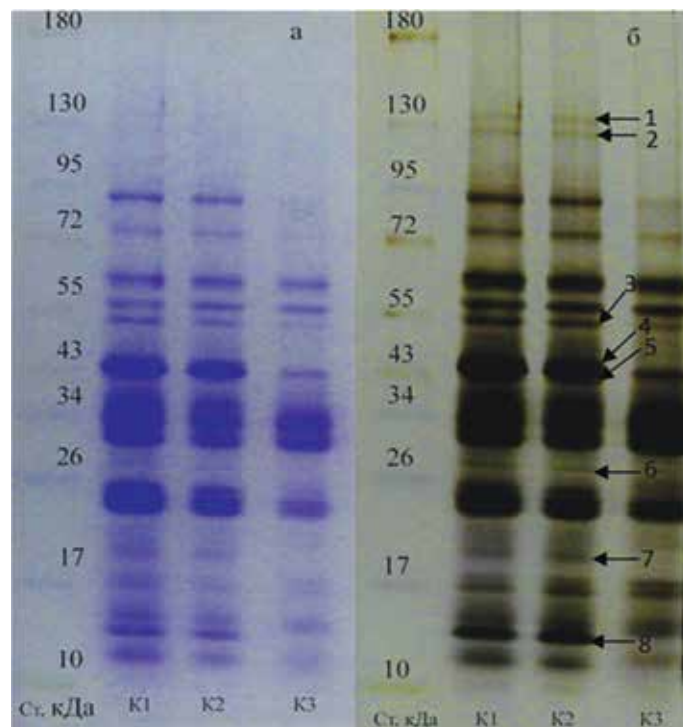


Fig. 1. One-dimensional SDS electrophoresis of meat product samples. Cr — mixture of standard proteins, K1 — sample 1, K2 — sample 2, K3 — sample 3. Left column (a) — staining with CBB G-250, Right column (b) — staining with silver nitrate.

When analyzing the results of protein fractionation in the studied samples, it was found that samples 1 and 2 were similar in the protein profile and had only insignificant differences (towards a decrease in sample 2) in the quantity of proteins in the zones 38–42, 23 and 15 kDa when staining CBB G-250, which gives high linearity of bonding with proteins. Sample 3 was clearly different from them, which can be explained by the differences in their compositions and production technology. It contained less protein fractions, and some of them disappeared practically completely. Staining by more sensitive method (with silver nitrate) confirmed the revealed changes and allowed detection of a range of other fractions that presented in the minor quantity and changed their quantity.

They included the fractions with the molecular weight of 132, 128, 75, 90, 53, 45, 36, 28, 20 and 16 kDa. The proteins of these fractions are the main components that generate short peptides. Eight of them were identified by time-of-flight mass-spectrometry.

Table 1. The composition of the bacterial community of horsemeat sausage, %

Microorganism	Sample		
	1	2	3
Bacteroidales	0	5.31 <i>Bacteroidetes</i>	20.06 <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Prevotella</i> sp.
Lactobacillales	52.45 <i>Lactobacillus</i> sp.	38.82 <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Lactobacillus manihotivorans</i>	29.62 <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus garvieae</i>
Bacillales	13.47 <i>Bacillus</i> sp., <i>Alicyclobacillus</i> sp.	7.73 <i>Alicyclobacillus</i> sp.	3.08 <i>Brevibacillus levickii</i> , <i>Saccharococcus thermophilus</i> , <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> , <i>Paenibacillus</i> sp.
Bifidobacteriales	0	0	0.77 <i>Bifidobacterium</i> sp.
Propionibacteriales	0	0	0.82 <i>Propionibacterium</i> sp.
Pseudomonadales	0	0.26 <i>Pseudomonas</i> sp.	4.69 <i>Pseudomonas</i> sp.
Burkholderiales	0	0	3.12 <i>Burkholderia</i> sp.
Proteobacteria	2.41 <i>Lysobacter</i> sp., <i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	13.83 <i>Sphingomonas</i> , <i>Lysobacter</i> sp., <i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	0.67 <i>Lysobacter</i> sp., <i>Brenneria quercina</i> , <i>Alteromonadaceae</i>
Acidobacteriales	0	2.33 <i>Acidobacterium</i> sp.	0
Clostridiales ( <i>Butyrivibrio</i> )	0	0.5 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0
Clostridiales ( <i>Eubacterium</i> )	0	0.74 <i>Eubacterium</i> sp.	0
Clostridiales ( <i>Clostridium</i> )	0	0	0.58 <i>Clostridium innocuum</i>
Thermoanaerobacterales	0	2.07 <i>Thermoanaerobacter cellulolyticus</i> , <i>Caldicellulosiruptor kronotskiensis</i>	0
Clostridiales ( <i>Succiniclasticum</i> )	0	0	0.65 <i>Succiniclasticum ruminis</i>
Campylobacterales	0	0.33 <i>Arcobacter</i> sp.	0
Enterobacteriales	0	0	0.14 <i>Brenneria quercina</i>
Actinobacteria	6.02 <i>Streptomyces</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp.	6.07 <i>Micromonospora</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Kocuria</i> sp.	9.28 <i>Streptomyces</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Saccharomonosporaglauca</i> , <i>Micromonospora</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Amycolatopsis</i> sp., <i>Catellatospora</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium bovis</i>
Clostridiales ( <i>Peptococcaceae</i> )	1.55 <i>Desulfotomaculum</i> sp.	0	1.35 <i>Desulfotomaculum</i> sp., <i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>
Unculturable microorganisms	24.1	22.01	25.17

Table 2. The results of the mass-spectrometric identification (MALDI-TOFMS and MS / MS) of the protein fractions differed in quantity in the studied samples

No	Protein, certain synonyms, ( <i>gene symbol</i> )	Numbers in Protein NCBI	S / M/ C*	M <sub>M</sub> , kDa (exper.)**	M <sub>M</sub> , kDa (calc.)**
1	Fragment (43-1221 a.s.) of amilo-1,6-glucosidase; glycogendebranchingenzyme ( <i>AGL</i> )	NP 001103778.1	163/22/18	132.0	174.6
2	myosin-bindingproteinC, fast-type ( <i>MYBPC2</i> )***(1)	XP 005596801.1	117/9/15	128.0	115.1
3	glucose-6-phosphate isomerase ( <i>GPI</i> )***(2)+ Acetyl (Protein N-term)	XP 001490657.2	79/15/27	53.0	62.7
4	phosphoglycerate kinase 1 homolog [Equusprzewalskii] ( <i>PGKI</i> )***(1)	XP 008508104.1	75/25/61	43.1	45.0
5	MixtureofpyruvatekinasePKMisoformM1 (PKM) andskeletal muscle alpha-actin homolog[Equusprzewalskii] ( <i>ACTA1</i> )	NP 00115316.1 XP 008531873.1	81/15/35 98/17/41	42.5	43.0 43.1
6	MixtureofaldolaseAfragment (88–331 a.s.); fructose-bisphosphate aldolase A ( <i>ALDOA</i> )***(1) andfragment (21-316) ofskeletal muscle alpha-actin homolog[Equusprzewalskii] ( <i>ACTA1</i> )***(2)	XP 003362760 XP 008531873.1	107/7/29 42/29/61	28.0	39.4 43.1
7	Homologoffragment (20–163 a.s.) oftroponinI, fastskeletal muscle ( <i>TNNI2</i> ) [Equusasinus]***(2)	XP 014685731.1	244/20/59	19.0	21.4
8	Myoglobin ( <i>MB</i> )***(1)	NP 001157488.1	96/12/76	16.0	17.1

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

Score — an indicator of matches or scoring;

Matchpeptides — the number of peptide matches;

Coverage — the percentage of the complete amino acid sequence of protein covered by revealed peptides.

\*\* M<sub>M</sub> (exper.) — assessments obtained by the results of the electrophoretic mobility on 2-DE, M<sub>M</sub> (calc.) — calculated assessments made on the basis of the data on the amino acid sequence with consideration for removal of the signal peptide, but without consideration for other post-synthetic modifications using the program ExPASy Compute pI/Mw tool

\*\*\* msms — indication of the confirming identification using the tandem mass-spectrometry. The number of sequenced tryptic peptides are given in parentheses.

For example, in samples 1 and 2, the fractions of amilo-1,6-glucosidase, fast-type muscle myosin-binding-protein C; glucose-6-phosphate isomerase; fast skeletal muscle troponin I, phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase and skeletal muscle actin were found, which were absent or reduced in sample 3. The results of identification are presented in Table 2.

Based on the results of the tandem mass-spectrometry, the proteins, which natural short peptides existed in the

analyzed extracts were identified by the obtained masses. Largely, they all belonged to different peptides of equine myoglobin (Table 3).

Samples 1 and 2 were similar in terms of spectra, which can be explained by the similarity of their composition and the conditions of the fermentation process; they had identical mass peaks, while sample 3 had more prominent differences.

A set of the same myoglobin peptides in the first two samples was absent in sample 3; however, its own peptide

Table 3. The results of the tandem mass-spectrometry of short peptides in sausage extracts

Protein	m/z, peptide amino acid sequence and position number in protein		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Myoglobin	(1239.6175) SKHPGDFGADA (115–125)	–	–
Myoglobin	(1424.7059) SKHPGDFGADAQG (115–127)	–	–
Myoglobin	–	–	(2504.3236) KKKGHHEAELKP-LAQSHATEHK (77–98)
Myoglobin	(2571.3249) GHHEAELKPLAQ- SHATEHKIPIK (80–102)	+	–
Myoglobin	(2844.4926) GGILKKKGHHEA-ELKPLAQSHATEHK (73–98)	+	–
Myoglobin	(2955.5830) KKKGHHEAELKP-LAQSHATEHKIPIK (77–102)	+	–
Unknown	(2000.9168) YKPEEEYPDI/LSKHNN (14–28)	+	+
Unknown	(1711.8415) VWGKVEADI/LAGHGQ	+	–
Unknown	–	–	(1858.9383) KI/LDESAKMEAETKI/LH
troponin T, fast skeletal muscle isoform (2–22)	+	+	(2637.9358) SDEEVHVEEEYEEEEEAQEE (2–22)

was revealed. The troponin T peptide was present in all three samples. Moreover, extended sequences of unknown proteins were detected. In analysis in manual mode, we were able to reveal that the peptide with m/z 2000.9168 is the peptide of 14–28 amino acid sequence of creatine kinase M of the muscle type; this peak is in all types of studied sausages.

### Conclusions

In analysis of microflora in three naturally fermented meat products from horsemeat (air dried sausage «Kazi» and uncooked smoked sausages «Balyk» by T-RFLP, it was established that lactic acid microorganisms prevailed over other groups of microorganisms. With that, unculturable microorganisms accounted for about a quarter of microflora.

In addition, several other microorganisms were detected such as *Microbacterium*, *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* sp., and *Flavobacterium* spp. Pathogenic microorganisms were not revealed in the samples.

The study of these products by one-dimensional electrophoresis showed the differences in the protein profile. The sausage sample «Balyk» contained less protein fragments than the «Kazi» samples.

The performed comparative proteomic study of three sausage types demonstrated quantitative differences by several fractions. Based on the results of the tandem mass spectrometry, the proteins and natural short peptides existed in the analyzed samples were identified. Largely, they all belonged to different peptides of equine myoglobin.

In general, good preservation of muscle proteins myosin and myoglobin, which can be a source of functional peptides, was observed. The differences in product protein profiles were, apparently, conditioned by the technological peculiarities of production and spontaneous course of the fermentation process.

Therefore, the spontaneous microflora of fermented meat products, especially upon prevalence of lactic acid microorganisms can affect the development of the biologically active peptides in meat, which is confirmed by the results of the study presented in this paper. Moreover, the applied approach and search algorithm can be used for search and identification of short natural peptides in sausage samples.

### Acknowledgments

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

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Hood, L., Flores, M. (2012). A personal view on systems medicine and the emergence of proactive P4 medicine: predictive, preventive, personalized and participatory. *New Biotechnology*, 29 (6), 613–624.
- Тутельян, В.А., Самсонов, М.А., Каганов, Б.С., Батурин, А.К., Шарафетдинов, Х.Х., Плотникова, О.А., Павлючкова, М.С. (2008). Картоотека блюд диетического (лечебного и профилактического) питания оптимизированного состава. Практическое руководство. М, Национальная ассоциация клинического питания.—448 с. ISBN978–5–85597–105–7
- Тутельян, В.А., Вялков, А.Н., Разумов, В.И., Москаленко, К.А., Одинец, А.Г., Сбежнева, В.Г., Сергеев, В.Н. (2010). Научные основы здорового питания. М, Панорама.—839 с. ISBN978–5–86472–224–4.
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219–229.
- Shishkin, S.S., Kovalev, L.I., Kovaleva, M.A., Ivanov, A.V., Eremina, L.S., Sadykhov, E.G. (2014). The application of proteomic technologies for the analysis of muscle proteins of farm animals used in the meat industry (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, 453–465.
- Olmedilla-Alonso, B., Jimenez-Colmenero, F., Sanchez-Muniz, F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95, 919–930.
- Te Pas, M.F.W., Kruijt, L., Pierzchala, M., Crump, R.E., Boeren, S., Keuning, E., Hoving-Bolink, R., Hortos, M., Gispert, M., Arnau, J., Diestre, A., Mulder, H.A. (2013). Identification of proteomic biomarkers in *M. longissimusdorsi* as potential predictors of pork quality. *Meat Science*, 95, 679–687.
- Yu, T. — Y., Morton, J.D., Clerens, S., Dyer, J.M. (2015). Proteomic Investigation of Protein Profile Changes and Amino Acid Residue Level Modification in Cooked Lamb Meat: The Effect of Boiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 9112–9123.
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V., Dinesh Kumar, B. (2015). Antiproliferative, ACE-inhibitory and functional properties of protein hydrolysates from rohu (*Labeorohita*) roe (egg) prepared by gastrointestinal proteases. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (12), 8300–8307.
- Meinert, L., Broge, E.H.D.L., Bejerholm, C., Jensen, K. (2016). Application of hydrolyzed proteins of animal origin in processed meat. *Food Science and Nutrition*, 4(2), 290–297.
- Lafarga, T., Rai, D. K., O'Connor, P., Hayes, M. (2015). A bovine fibrinogen-enriched fraction as a source of peptides with *in vitro* renin and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 8676–8684.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Michalska, J. (2011). Bovine meat proteins as potential precursors of biologically active peptides — a computational study based on the BIOPEP database. *Food Science and Technology International*, 17, 39–45.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 172–188.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides — Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297–1308.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, 217–246.
- Doeven, M. K., Kok, J., Poolman, B. (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*, 57, 640–649.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 393–409.
- Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406.
- Hébert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P., Addeo, F. (2008). Characterization of the pattern of  $\alpha$ s1- and  $\beta$ -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12), 3682–3689.
- Hébert, E. M., Raya, R. R., de Giori G. S. (1999). Characterisation of a cell-envelope proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Letters*, 21(9), 831–834.
- Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163–169.
- Singh, V. P., Pathak, V., Verma, A. K. (2012). Fermented meat products: organoleptic qualities and biogenic amines—A review. *American Journal of Food Technology*, 7, 278–288.

23. Гааль, Э., Медбеши, Г., Верецкеи, Л. (1982). Электрофорез в разделении биологических макромолекул. (Перевод с английского канд. биол. наук Е. Б. Майзеля, канд. биол. наук М. С. Морозовой и канд. биол. наук С. Н. Хилько, под редакцией проф. В. И. Розенгарта). М, Мир. — 448 с.

24. Ковалев, Л.И., Шишкин, С.С., Ковалева, М.А., Иванов, В.В., Вострикова, Н.Л., Чернуха, И.М. (2013). Протеомное изучение белков в образцах свинины и выработанных из нее мясных продуктах. *Все о мясе*, 3, 32–34.

25. Kovalyov, L. I., Kovalyova, M. A., Kovalyov, P. L., Serebryakova, M. V., Moshkovskii, S. A., Shishkin, S.S. (2006). Polymorphism of  $\Delta 3,5\text{-}\Delta 2,4$ -dienoyl-coenzyme a isomerase (the ECH1 gene product protein) in human striated muscle tissue. *Biochemistry (Moscow)*, 71(4), 448–453.

26. Zvereva, E.A., Kovalev, L.I., Ivanov, A.V., Kovaleva, M.A., Zherdev, A.V., Shishkin, S.S., Lisitsyn, A.B., Chernukha, I.M., Dzantiev, B.B. (2015). Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. *Meat Science*, 105(1), 46–52.

## REFERENCES

1. Hood, L., Flores, M. (2012). A personal view on systems medicine and the emergence of proactive P4 medicine: predictive, preventive, personalized and participatory. *New Biotechnology*, 29 (6), 613–624.

2. Tutel'yan, V.A., Samsonov, M.A., Kaganov, B.S., Baturin, A.K., Sarafetdinov, H.H., Plotnikova, O.A., Pavluchkova, M.S. (2008). Card catalogue of dishes of dietary (curative and prophylactic) nutrition of the optimized composition. Practical guideline. M.: National association of clinical nutrition.— 448 p. ISBN 978–5–85597–105–7. (in Russian).

3. Tutel'yan V.A., Vyalkov A.I., Razumov A.N., Mikhailov V.I., Moskalenko K.A., Odinets A.G., Sbezhneva V.G., Sergeev V.N. (2010). Scientific foundations of healthy nutrition. M, Panorama. — 839 p. ISBN 978–5–86472–224–4. (in Russian).

4. Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219–229.

5. Shishkin, S.S., Kovalev, L.I., Kovaleva, M.A., Ivanov, A.V., Ermina, L.S., Sadykhov, E.G. (2014). The application of proteomic technologies for the analysis of muscle proteins of farm animals used in the meat industry (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, 453–465.

6. Olmedilla-Alonso, B., Jimenez-Colmenero, F., Sanchez-Muniz, F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95, 919–930.

7. Te Pas, M.F.W, Kruijt, L., Pierzchala, M., Crump, R.E., Boeren, S., Keuning, E., Hoving-Bolink, R., Hortos, M., Gispert, M., Arnau, J., Diestre, A., Mulder, H.A. (2013). Identification of proteomic biomarkers in *M. Longissimusdorsi* as potential predictors of pork quality. *Meat Science*, 95, 679–687.

8. Yu, T. — Y., Morton, J.D., Clerens, S., Dyer, J.M. (2015). Proteomic Investigation of Protein Profile Changes and Amino Acid Residue Level Modification in Cooked Lamb Meat: The Effect of Boiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 9112–9123.

9. Chalamaiyah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V., Dinesh Kumar, B. (2015). Antiproliferative, ACE-inhibitory and functional properties of protein hydrolysates from rohu (Labeorohita) roe (egg) prepared by gastrointestinal proteases. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52 (12), 8300–8307.

10. Meinert, L., Broge, E.H.D.L., Bejerholm, C., Jensen, K. (2016). Application of hydrolyzed proteins of animal origin in processed meat. *Food Science and Nutrition*, 4(2), 290–297.

11. Lafarga, T., Rai, D. K., O'Connor, P., Hayes, M. (2015). A bovine fibrinogen-enriched fraction as a source of peptides with in vitro renin and angiotensin-i-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 8676–8684.

12. Minkiewicz, P., Dziuba, J., Michalska, J. (2011). Bovine meat proteins as potential precursors of biologically active peptides — a computational study based on the BIOPEP database. *Food Science and Technology International*, 17, 39–45.

13. Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 172–188.

14. Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides — Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297–1308.

15. Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, 217–246.

16. Doeven, M. K., Kok, J., Poolman, B. (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*, 57, 640–649.

17. Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 393–409.

18. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406.

19. Hébert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P., Addeo, F. (2008). Characterization of the pattern of  $\alpha$ s1- and  $\beta$ -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12), 3682–3689.

20. Hébert, E. M., Raya, R. R., de Giori G. S. (1999). Characterisation of a cell-envelope proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Letters*, 21(9), 831–834.

21. Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163–169.

22. Singh, V. P., Pathak, V., Verma, A. K. (2012). Fermented meat products: organoleptic qualities and biogenic amines—A review. *American Journal of Food Technology*, 7, 278–288.

23. Gaal, O., Medgyesi, G.A., Vereczkey, L. (1980). Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules. Budapest, Akademiai Kiado.

24. Kovalyov, L.I., Shishkin, S.S., Kovalyova, M.A., Ivanov, A.V., Vostrikova, N.L., Chernukha, I.M. (2013). Proteomic research proteins in a sample of pork meat products. *Vsyo o myase*, 3, 32–34. (in Russian).

25. Kovalyov, L. I., Kovalyova, M. A., Kovalyov, P. L., Serebryakova, M. V., Moshkovskii, S. A., Shishkin, S.S. (2006). Polymorphism of  $\Delta 3,5\text{-}\Delta 2,4$ -dienoyl-coenzyme a isomerase (the ECH1 gene product protein) in human striated muscle tissue. *Biochemistry (Moscow)*, 71(4), 448–453.

26. Zvereva, E.A., Kovalev, L.I., Ivanov, A.V., Kovaleva, M.A., Zherdev, A.V., Shishkin, S.S., Lisitsyn, A.B., Chernukha, I.M., Dzantiev, B.B. (2015). Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. *Meat Science*, 105 (1), 46–52.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

## Принадлежность к организации

**Чернуха Ирина Михайловна** — доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Руководитель научного направления центра, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН

109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Тел.: раб. +7-495-676-97-18

E-mail: imcher@inbox.ru

**Никонов Илья Николаевич** — заместитель директора по науке и развитию, ООО «БИОТРОФ»

196650, г. С.-Петербург, г. Колпино, Ижорский Завод, д. 45, литера ДВ

Тел.: +7-812-322-85-50

E-mail: nikonov@biotrof.ru

**Машенцева Наталья Геннадьевна** — доктор технических наук, профессор РАН, заведующий кафедрой «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза», Московский государственный университет пищевой промышленности

125080 г. Москва, Волоколамское шоссе, 11

Тел.: +7-499-811-00-03, доб. 6883

E-mail: natali-mng@yandex.ru

**Клабукова Дарья Леонидовна** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела технологий и препаратов на основе культур клеток, Институт прикладной биохимии и машиностроения «Биохиммаш»

127299, Москва, ул. Клары Цеткин, д. 4

Тел.: +7-495-459-06-64

E-mail: daria.klabukova@yandex.ru

\*автор для контактов

**Афанасьев Дмитрий Александрович** — студент, Институт инновационных технологий и биоиндустрии продуктов питания, Московский государственный университет пищевой промышленности

125080 г. Москва, Волоколамское шоссе, 11

Тел.: +7-985-456-77-82

E-mail: dmitr.afanasjew2010@yandex.ru

**Ковалев Леонид Иванович** — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

Телефон: раб. +7-495-952-58-86

E-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

**Ильина Лариса Александровна** — кандидат биологических наук, начальник лаборатории ООО «БИОТРОФ»

196650, г. С.-Петербург, г. Колпино, Ижорский Завод, д. 45,

литера ДВ

Тел.: +7-812-322-85-50

E-mail: ilina@biotrof.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 27.09.2017

## AUTHOR INFORMATION

## Affiliation

**Irina M. Chernukha** — doctor of technical sciences, professor, corresponding members of RAS, Head of the scientific direction of the center, V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel.: +7-495-676-97-18

E-mail: imcher@inbox.ru

**Ilya N. Nikonov** — deputy director for research and development, «BIOTROPH» Limited

196650, St. Petersburg, Kolpino, Izhorsky factory, 45, lit. DV

Tel.: +7-812-322-85-50

E-mail: nikonov@biotrof.ru

**Natalya G. Mashentseva** — doctor of technical sciences, professor RAS, head of the Department of Biotechnology and Technology of Products of Bioorganic Synthesis, Moscow state university of food production

125080, Moscow, Volokolamskoe sh., 11

Tel.: +7-499-811-00-03, ext. 6883

E-mail: natali-mng@yandex.ru

**Daria L. Klabukova** — candidat of biological sciences, senior research scientist of Department of technologies and products based on cell cultures

OJSC Institute of Applied Biochemistry and Mechanical Engineering «Biochimash»

127299, Moscow, Clary Tcetkin str., 4

Tel.: +7-495-459-06-64

E-mail: daria.klabukova@yandex.ru

\*corresponding author

**Dmitrii A. Afanasev** — student, Institute of Innovative Technologies and Bioindustry of Food Products, Moscow State University of Food Production

125080, Moscow, Volokolamskoe sh., 11

Tel.: +7-985-456-77-82

E-mail: dmitr.afanasjew2010@yandex.ru

**Leonid I. Kovalyov** — doctor of biological sciences, leading research scientist of the biomedical research laboratory, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, Leninsky prospekt, 33 bldg. 2

Phone: +7-495-952-58-86

E-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

**Larisa A. Ilina** — candidat of biological sciences, head of laboratory, «BIOTROPH» Limited

196650, St. Petersburg, Kolpino, Izhorsky factory, 45, lit. DV

Tel.: +7-812-322-85-50

E-mail: ilina@biotrof.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 27.09.2017