

# 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,

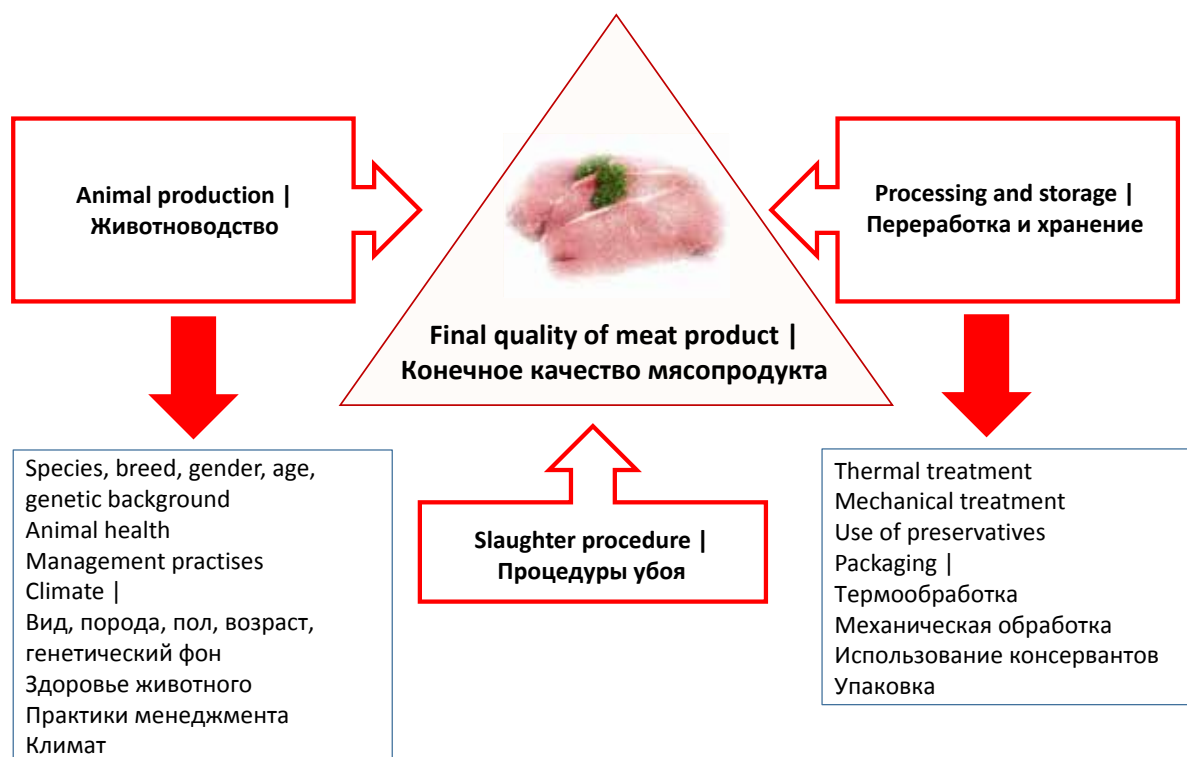


Figure 1. Factors determining final quality of meat product

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

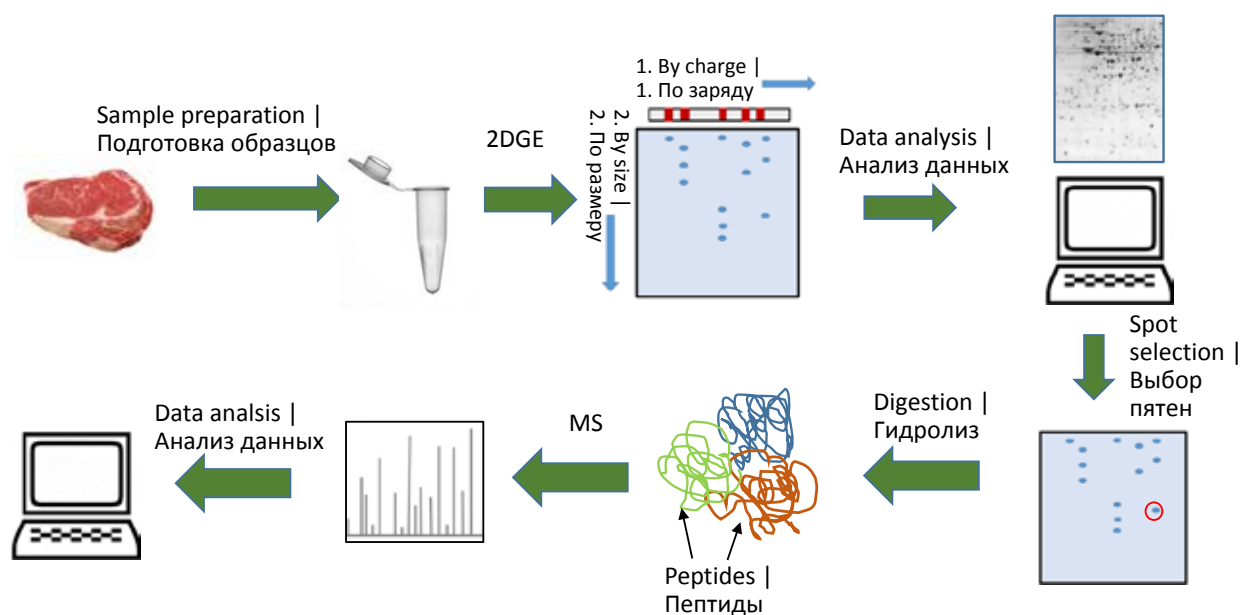


Figure 2. A schematic representation of the proteomics workflow

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 единственным 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 immunologically 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