СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2018, том 53, № 6, с. 1247-1261

Функциональность пищевых продуктов

УДК 637.03:573.6.086.83.001.26 doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1247rus

ОБРАЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ В МЯСНОМ СЫРЬЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОТЕАЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ*

И.М. ЧЕРНУХА[1], Н.Г. МАШЕНЦЕВА[1], Н.Л. ВОСТРИКОВА[1], Л.И. КОВАЛЕВ[2], М.А. КОВАЛЕВА[2], Д.А. АФАНАСЬЕВ[3], А.А. БАЖАЕВ[3]

В настоящее время с целью технологической коррекции мясного сырья и повышения функциональности мясных продуктов применяется множество методов, среди которых значительный интерес вызывает ферментолиз. Для этого используются протеазы микробного, растительного или животного происхождения. При ферментативной обработке мясных продуктов саркоплазматические и миофибриллярные белки подвергаются протеолизу, в результате чего образуются пептиды, в том числе обладающие высокой физиологической активностью и выраженным лечебно-профилактическим действием. Обычно это низкомолекулярные соединения, состоящие из нескольких аминокислотных остатков. Важная особенность таких пептидов в том, что в отличие от лекарственных средств они способны быстро проникать через мембраны желудочно-кишечного тракта и далее в кровеносную систему и остальные системы организма. Мы изучили образование биопептидов в различном мясном сырье под воздействием ферментов животного (пепсин, трипсин) и растительного (папаин, бромелайн) происхождения. Образцы скелетной мышцы крупного рогатого скота *Bos taurus* и свиньи *Sus scrofa* инъецировали растворами протеаз в количестве 5 мл на 50 г мясного сырья. Ферментируемые образцы выдерживали в течение 40 мин при 30 °С для препаратов трипсина и пепсина, 30 мин при 30 °С — для папаина и бромелайна. Оптимальное значение pH для ферментов в образцах не устанавливали, ферментацию осуществляли при нативном pH мясного сырья. Влажность воздуха в помещении составляла 50-55 %. Контролем служили соответствующие образцы мышцы без ферментативной обработки. По результатам проведенного одномерного денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) выявлены явные количественные различия в белковых профилях исследуемого сырья, при этом для протеаз разного происхождения получили неодинаковые профили. Последующий двумерный электрофореза с изоэлектрофокусированием в амфолиновом градиенте pH (IEF-PAGE) подтвердил полученные результаты и выявил особенности используемых протеаз. Так, животные протеазы, обладая высокой специфичностью, воздействуют лишь на определенную часть мышечных белков, но практически полностью деструктурируют их до небольших пептидов (в том числе низкомолекулярных) и свободных аминокислот. Следует также отметить большую протеолитическую эффективность трипсина по сравнению с пепсином. Протеазы растительного происхождения с достаточно низкой специфичностью воздействуют на большинство мышечных белков и деструктурируют их до множества фрагментов, о чем свидетельствует появление многочисленных новых белковых фракций на 2D электрофореграмме. С помощью масс-спектрометрии были обнаружены и идентифицированы некоторые короткие пептиды в образцах с животными протеазами. После обработки растительными протеазами обнаружить короткие пептиды практически не удалось из-за недостаточной пригодности масс-спектрометрии для определения образовавшихся очень низкомолекулярных пептидов. Таким образом, растительные протеазы более активно и эффективно образуют промежуточные фракции ряда мышечных белков и биопептидов. Обработку сырья протеолитическими ферментами, на наш взгляд, можно считать наиболее эффективным способом получения биологически активных пептидов.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, ферментолиз, биологически активные пептиды, одномерный электрофорез, SDS-PAGE, двумерный электрофорез, IEF-PAGE, MALDI-TOF, масс-спектрометрическая идентификация.

Увеличение объемов мясного сырья от животных, выращенных в интенсивных условиях промышленных комплексов, приводит к росту количества мяса с нетрадиционными технологическими характеристиками и актуализирует проблему его эффективной переработки. Так, интенсивная эксплуатация и целенаправленная селекция свиней на мясность, безвыгульное содержание, формирование больших групп, ранний отъем поросят, а также значительные колебания микроклимата превосходят адаптив-

* Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 16-16-10073).

ные возможности животных, снижают резистентность к технологическим стрессам и отрицательно влияют на качество мяса (1). Основной причиной появления экссудативности и темного клейкого мяса считают гиподинамию, интенсивный откорм при промышленном выращивании и последствия селекции на мясность, приводящей к нарушениям метаболизма гликогена (2). Проблема эффективного использования такого мяса и повышения его пищевой, в том числе биологической, ценности может быть решена посредством целенаправленной ферментативной модификации (3-5).

В последнее десятилетие особое внимание уделяется веществам белковой природы — биологически активным пептидам (6). Их наличие в сырье и готовых мясных продуктах способствует лучшему усвоению белков животного происхождения (7-9). Миофибриллярные белки распадаются до полипептидов под действием эндогенных ферментов мышц, прежде всего катепсина D (при низком показателе pH), и далее до пептидов и свободных аминокислот. Пептиды разлагаются эндогенными и микробными ферментами на свободные аминокислоты, причем деградацию в первую очередь определяют значения pH (10).

Протеолитическая активность штаммов молочнокислых бактерий исследована на мясном сырье, в том числе на саркоплазматических и миофибриллярных белках (11-13). Так, под воздействием клеток и клеточных экстрактов штамма *Lactobacillus plantarum* CRL 681, первоначально выделенного из мясных продуктов, происходил протеолиз как саркоплазматических, так и миофибриллярных белков с образованием различных пептидов гидрофобной природы. При протеолизе миофибриллярных белков максимально увеличивалось количество лизина, аргинина и лейцина, а из саркоплазматических белков в основном высвобождался аланин (11). Подобное исследование проводили для *L. curvatus* CECT 904 и *L. sakei* CECT 4808. Для обоих штаммов отмечена активность протеиназы в отношении саркоплазматических белков, причем инокуляция целых клеток вызывала деградацию пептидов, тогда как при добавлении клеточных экстрактов образовались гидрофильные и гидрофобные пептиды. Кроме того, для штамма *L. sakei* выявлена более высокая степень образования свободных аминокислот (12). Эти же авторы оценивали активность протеиназы и аминопептидазы *L. casei* CRL 705 в отношении мышечных белков. Протеиназы целых клеток расщепляли саркоплазматические белки с образованием широкого спектра пептидов, частичный гидролиз был также связан с клеточными экстрактами. При объединении клеток и клеточных экстрактов с экстрактами саркоплазматического белка пептидные профили сильно изменялись и отмечалась более значительная генерация свободных аминокислот (13).

Функционально активными могут быть как нативные амнокислотные последовательности, так и образовавшиеся в процессе автолиза, ферментолиза пептидов, при термической и других технологических обработках. Обнаружены и изучены биоактивные пептиды, обладающие гипотензивным, опиоидным, антиоксидантным, антитромботическим, антимикробным, иммуномодулирующим и другими биологическими эффектами, оказывающими лечебное или профилактическое воздействие на патогенез ряда заболеваний (14, 15). Поскольку большинство из известных в настоящее время биологически активных пептидов не проникает из пищеварительного тракта в кровь, их действие, вероятно, опосредовано через рецепторы кишечного эпителия или осуществляется непосредственно в просвете кишечника (15, 16). Такие пептиды высвобождаются и активируются при пищеварении в желудочно-кишечном тракте или в процессе производственной переработки мяса (17). В частности, при производственном протеолизе (суш-

ка, ферментация) высвобождаются ингибиторы АПФ-I и пептиды с антиоксидантной активностью (18). Активность пептидов зависит от аминокислотного состава, молекулярной массы и длины цепи, типа и заряда аминокислоты на N- и C-конце, гидрофобных и гидрофильных свойств, пространственной структуры и т.д. Например, пептиды с более высокой ингибирующей активностью ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) обычно имеют ароматические или щелочные аминокислоты на N-конце, большее количество гидрофобных и положительно заряженных аминокислот на C-конце (19). Взаимосвязь между активностью и структурой пептидов в настоящее время изучается. Многие биологически активные пептиды природного происхождения структурно отличаются от пептидов, образующихся в результате посттрансляционной модификации белков. В их составе присутствуют небелковые аминокислоты (β-аланин, γ-аминомасляная кислот), D-аминокислоты, алкилированные аминокислоты. Для низкомолекулярных пептидов характерны H-пептидные связи и кольцевые структуры. Вместе с остатками пироглутаминовой кислоты они обеспечивают защиту от протеаз с субстратной специфичностью в отношении пептидов из α-аминокислот с нормальными связями, что позволяет сохранять функциональность пептида до момента усвоения (3, 14). Из мясного сырья уже выделено значительное количество пептидов, содержащих 2-9, реже до 25 аминокислотных остатков в строго определенной последовательности (20). Многие из них получены с помощью протеолиза ферментами различного происхождения.

Пепсин, член семейства пептидазы A1, — это преобладающая пищеварительная протеаза в желудочном соке позвоночных. В отличие от некоторых других эндопептидаз он гидролизует только пептидные связи, но не непептидные амидные или сложноэфирные связи. При обработке пепсином неочищенной миозиновой легкой цепи был обнаружен ингибирующий АПФ октапептид, который оценили как временно эффективное гипотензивное вещество (21). Другой пептид, полученный при гидролизе пепсином миозина свиньи, сохранял ингибирующую АПФ активность после нагревания миозина B при 98 °C в течение 10 мин (22). Доказано, что биологически активные пептиды могут быть получены не только из миофибриллярных белков, но и из регуляторных белков, таких как тропонин и тропомиозин. В 2003 году АПФ-ингибирующий пептид был выделен из свиного тропонина C, гидролизованного пепсином. Этот пептид показал относительно высокую устойчивость к пищеварительным протеазам, и можно ожидать, что он будет функционировать in vivo в качестве антигипертензивного агента (23). В другом эксперименте после обработки пепсином идентифицированы два новых ингибирующих АПФ-I пептида из скелетного тропонина свиньи. Один из них показал самую сильную ингибирующую АПФ активность среди ранее зарегистрированных пептидов, полученных из тропонина (24). Трипсин относится к сериновым протеиназам и синтезируется поджелудочной железой в виде неактивного предшественника (профермента) трипсиногена. Трипсин гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами L-аргинина и L-лизина. Папаин представляет собой неспецифическую тиол-протеазу и основную составляющую белка млечного сока тропического растения *Caricapapaya.* Благодаря своим протеолитическим свойствам он используется в пищевой промышленности для умягчения мяса (25, 26). Папаин (300 ед/кг) использовали для увеличения количества свободных аминокислот в сухих ферментированных колбасах (27). Оценена in vivo антитромботическую активность папаинового гидролизата из обезжиренного свиного мяса (неочищенные фрагменты и пептиды, очищенные катионообменной хроматографией) (28). После перорального введения

мышам начальная пептидная фракция со средней молекулярной массой 2500 Да показала антитромботическую активность в дозе 210 мг/кг массы тела, а фракция 2517 Да, очищенная катионообменной хроматографией, — в дозе 70 мг/кг (ее активность была эквивалентна таковой у аспирина в дозе 50 мг/кг). Растительный фермент бромелайн в больших количествах присутствует во фруктах, листьях и стеблях растений семейства *Bromeliacea*, из которых наиболее известен ананас (*Ananas comosus*). Как и другие протеазы, он деградирует миофибриллярные белки и коллаген, что часто приводит к умягчению мяса (29). Исследовалось влияние бромелайна, папаина и коллагенолитического фермента MCP-01 на мясо говядины при низких температурах (4 °С). С помощью сканирующей электронной микроскопии были выявлены различия в разрушении мышечных волокон (30).

Мы впервые установили, что при обработке говядины и свинины ферментами животного (пепсин, трипсин) и растительного (бромелайн, папаин) происхождения образование биологически активных пептидов наиболее вероятно при использовании растительных ферментов.

Целью нашей работы было изучение образования в мясном сырье пептидов, предположительно имеющих биологическую активность, под воздействием ферментов животного и растительного происхождения.

Методика. Использовали мясо крупного рогатого скота (КРС) (*Bos taurus*) (тазобедренная часть) и свиньи (*Sus scrofa*) (карбонат), хранившееся после убоя в течение 48 ч при 2±2 °С. Изучали воздействие следующих ферментов: пепсин из слизистой оболочки желудка свиней (10000 ед/г) и трипсин из поджелудочной железы быка (2000 ед/г) («HIMEDIA», Индия); папаин из млечного сока папайи (1100 ед/г) и бромелайн из ствола ананаса (1310 ед/г) («Sigma», США). При одномерном электрофорезе использовали ферменты в концентрациях 0,5; 1,5; 2,5 %. По результатам выявляли эффективные концентрации, и образцы направляли на фракционирование методом двумерного электрофореза.

В порции цельной мышцы (500 г) инъецировали растворы протеаз (5 мл на 50 г мясного сырья), выдерживали 40 мин при 30 °С для препаратов трипсина и пепсина, 30 мин при 30 °С — для папаина и бромелайна. Ферментацию осуществляли при нативном pH мясного сырья. Влажность воздуха в помещении — 50-55 %.

Фракционный состав белков анализировали методом одномерного электрофореза в полиакриламидном геле (12,5 % SDS-PAGE) в камере VE-10 («Helicon», Россия) при постоянном напряжении 160 В. По достижении фронтом разделяющего геля увеличивали напряжение до 180 В и продолжали разделение в течение 4-5 ч. Количество внесенного белка — 20 мкг для образца. Образцы животной ткани (1 г) гомогенизировали, белки экстрагировали 3 мл дистиллированной воды. Полученную массу переносили в пробирку (эппендорф). Взвесь центрифугировали 8 мин при 14000 g. В чистый эппендорф отбирали 1 мл супернатанта и приливали 1 мл буфера для приготовления проб (с красителем). Пробы погружали в кипящую водяную баню и нагревали 2-3 мин при 95-100 °С. В лунки геля вносили по 10-20 мкл полученной смеси. Маркером служила смесь 11 рекомбинантных белков (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 кДа) («Thermo», США). Для окрашивания использовали раствор Кумасси R-250 («Fisher Bioreagents», Англия). Белковый состав анализировали с помощью базы данных UniProt Protein Database (http://www.uniprot.org/) (31).

Двумерный (2D) электрофорез выполняли по О'Фарреллу с изоэлектрофокусированием в амфолиновом градиенте pH (IEF-PAGE); последующую детекцию белков проводили окрашиванием азотнокислым се-

ребром (32). При подготовке препаратов для 2D электрофореза 100 мг измельченного образца гомогенизировали в 2 мл лизирующего раствора (9 М мочевина, 5 % меркаптоэтанола, 2 % Тритона Х-100, 2 % амфолинов, pH 3,5-10, система тефлон—стекло). Гомогенат осветляли центрифугированием (5 мин, 800 g), надосадочную фракцию, содержащую экстракт белков, использовали для фракционирования в равных нанесениях по 50-75 мкл.

После трипсинолиза белковые фракции идентифицировали методами MALDI-TOF (опосредованная матрицей времяпролетная лазерная десорбция/ионизация) и MS/MS (тандемная) масс-спектрометрии (масс-спектрометре Ultraflex, «Bruker», Германия) с УФ-лазером (λ = 336 нм) в режиме детекции положительных ионов в диапазоне масс 500-8000 Да с их калибровкой по известным пикам автолиза. Для изучения спектра коротких пептидов (с m/z 1500-5000) 100 мг препарата гомогенизировали в 2 мл буфера (5,8 мг KH_2PO_4; 232 мг $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; 2,2 г NaCl; 0,5 мл 10 % Тритона Х-100; 1,87 г KCl) и дополнительно разводили водой до 50 мл. Гомогенат осветляли центрифугированием (5 мин, 800 g). В надосадочной фракции определяли спектры пептидов. Анализ масс-спектров триптических пептидов выполняли с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («MatrixScience», США) при точности определения массы MH^+ 0,01 % с поиском по базам данных NCBI (33, 34).

Результаты. В мясе КРС (рис. 1, А) под действием ферментов животного происхождения несколько увеличилось количество белков с молекулярной массой более 70 кДа (предположительно миозин и α-актинин), что свидетельствует о протеолитических изменениях в актомиозиновом комплексе. Белки 25-70 кДа изменялись незначительно. В зоне ниже 15 кДа формировались новые белковые полосы, что свидетельствовало о накоплении низкомолекулярных фрагментов, отщепившихся от мажорных белков. Действие пепсина и трипсина на белки КРС практически не различалось.

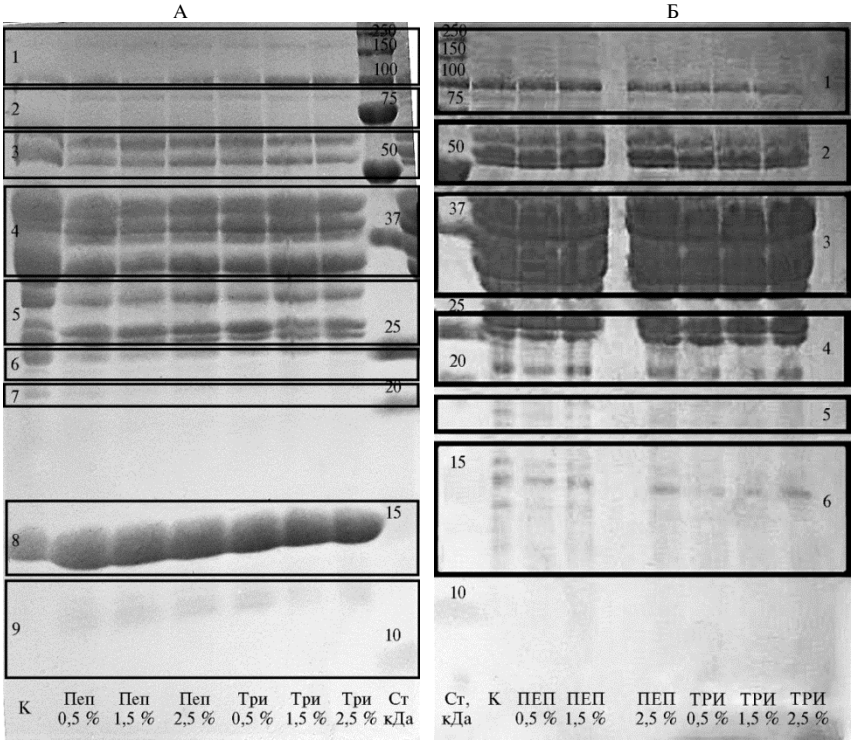


Рис. 1. Одномерный электрофорез скелетной мышцы крупного рогатого скота *Bos taurus* (тазобедренная часть) (А) **и свиньи *Sus scrofa* (карбонат)** (Б) **при обработке образцов ферментами**

животного происхождения: Ст — белковый маркер, К — контроль (без обработки ферментами), ПЕП — пепсин, ТРИ — трипсин; 0,5 %, 1,5 %, 2,5 % — концентрации ферментов.

А: 1 — миозин-10 (222,9-229 кДа); 2 — α-актинин (102-105 кДа); 3 — эластин (64-72 кДа), десмин (53-55 кДа); 4 — α- и β-тубулин (47-52 и 35-52 кДа), α-актин (41,5-42 кДа); 5 — тропонин-Т скелетно-мышечный быстрого/медленного типа (30-32 кДа), α/β-тропомиозин (32,5-32,7 кДа); 6 — тропонин-Т скелетно-мышечный быстрого типа (25-33 кДа), тропонин-1 (23-25 кДа); 7 — кофилин 2 (21-22,5 кДа); 8 — гемоглобин (15 кДа); 9 — фрагменты высокомолекулярных белков.

Б: 1 — тяжелые цепи миозина (205-210 кДа), α-актинин (100 кДа), мышечная креатинкиназа (80 кДа); 2 — эластин (64-66 кДа), α- и β-тубулин (53 и 55 кДа); 3 — G-актин (42 кДа), тропомиозин-1 (39 кДа), тропонин-Т (35-38 кДа), тропомиозин-2 (32 кДа); 4 — легкие цепи миозина-1 (16-27 кДа), тропонин-1 (23-25 кДа), легкие цепи миозина-А1 (20,7 кДа); 5 — тропонин С (20 кДа), легкие цепи миозина-2 (18 кДа); 6 — миоглобин (17 кДа), скелемин (15 кДа), белок, связывающий жирные кислоты (14-15 кДа), фрагменты миоглобина (8-12 кДа).

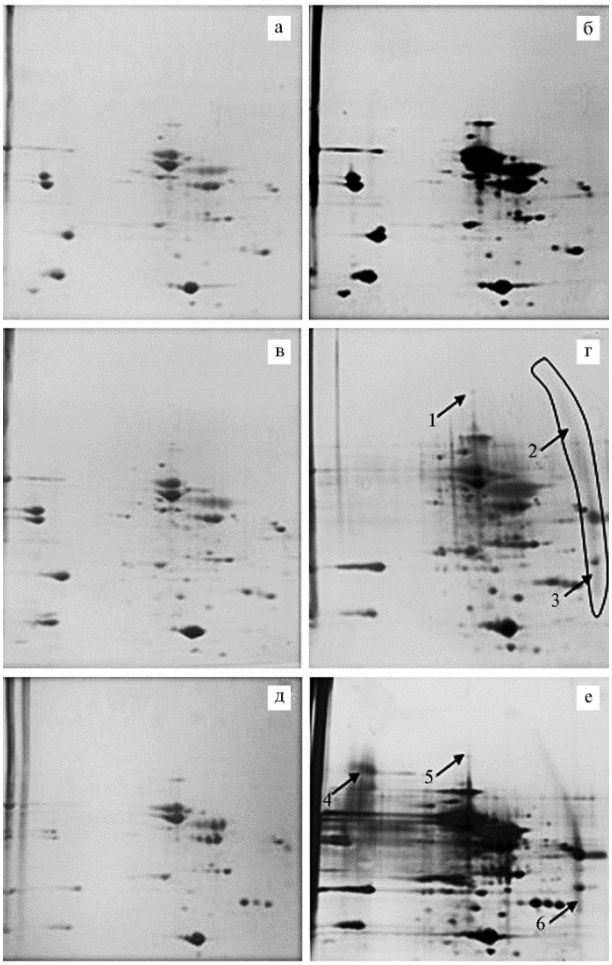


Рис. 2. Двумерный электрофорез белков скелетной мышцы крупного рогатого скота *Bos taurus* (тазобедренная часть) при обработке образцов ферментами животного происхождения: а, б — контроль; в, г — обработка 1,5 % пепсином; д, е — обработка 1,5 % трипсином; слева — окрашивание Кумасси R-250, справа — азотнокислым серебром. Стрелками с номерами обозначены зоны нетипичных фрагментов и агрегатов мышечных белков: 1, 5 — трек фрагментов митохондриальной аконитазы 2 (продукт гена *ACO2*), 2, 3, 6 — агрегат фрагментов (60-278 а.о.) изоформы 2 белка 1, содержащего 4,5 LIM домена (*FHL1*), 4 — фрагмент (530-1912 а.о.) миозина-1 (*MYH1*).

В мясе свиньи (рис. 1, Б) уменьшалось содержание тяжелых цепей миозина. Значительной деструкции подвергался белок массой около 18 кДа (предположительно он соответствует легким цепям миозина 2). В образцах с пепсином значительно снижалась интенсивность полос 14 кДа (предположительно рибонуклеаза) и 8-12 кДа (предположительно α- и β-хемокины), с трипсином — эти полосы отсутствовали. Отметим, что у трипсина действие на мясо свиньи более выражено, чем у пепсина.

Компьютерная денситометрия при 2D электрофорезе с окрашиванием реагентом Кумасси R-250 показала уменьшение суммарного количества белков на 15-37 %. Более чувствительный метод окрашивания азотнокислым серебром позволил выявить ряд промежуточные фрагменты в виде полос деградированных треков мажорных белков — мышечной креатинфосфокиназы, альдолазы А, митохондриальной аконитазы и β-енолазы. Более того, при 2D электрофорезе (рис. 2) детектировались фрагменты С-конца тяжелой цепи миозина, в норме агрегирующей на старте геля при IEF, что свидетельствует о протеолити-

ческих изменениях в актомиозиновом комплексе.

Особое внимание привлекло наличие в щелочной зоне трека белка (в овале, см. рис. 2), перекрывающего диапазон масс от 400 до 5 кДа. Для выявления его природы исследовали фрагменты этого трека в верхней и нижней зонах. Во всех случаях его идентифицировали как белок 1 изоформа 2, содержащий 4,5 LIM домена, с массой не более 32 кДа. Однако наблюдаемое распределение фрагментов было значительно шире. То есть при протеолитической обработке этот белок, очевидно, сохранял коровую часть (позиции 60-278-я) с образованием агрегатов, формирующих необычный электрофоретический трек.

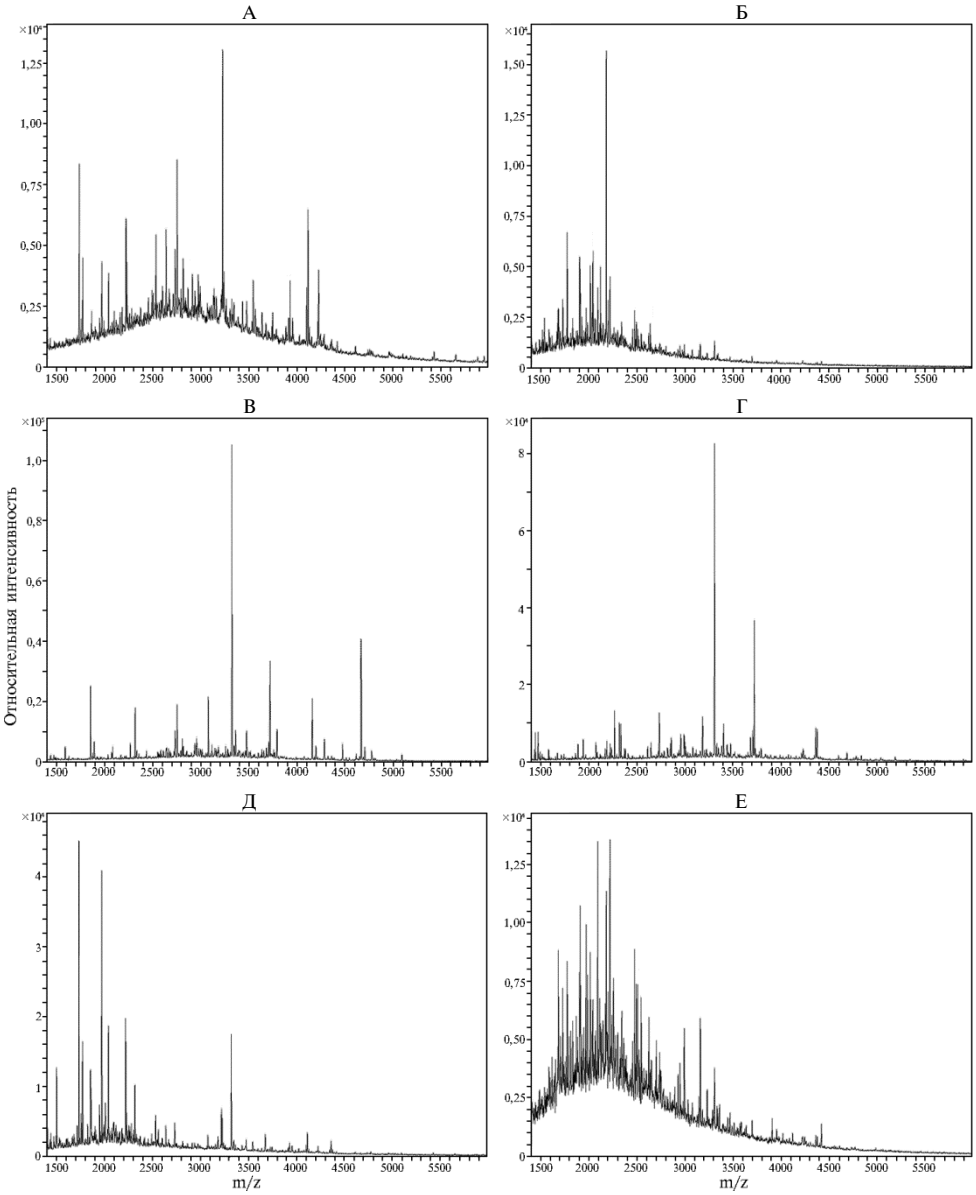


Рис. 3. Спектры триптических пептидов скелетной мышцы крупного рогатого скота *Bos taurus* (тазобедренная часть) (слева) **и свиньи *Sus scrofa* (карбонат)** (справа) **в диапазоне m/z 1500-5000:** А, Б — контроль, В, Г — 1,5 % пепсин, Д, Е — 1,5 % трипсин. Описание идентифицированных пептидов с m/z 1853.8, 3077.4, 4157.8, 4665.5, 3322.8, 1940.9 и 1952.9 см. в таблице 1.

Так как 2D электрофорез выявил уменьшение количества белкового материала после воздействия протеаз, мы изучили изменения в спек-

трах коротких пептидов (содержащие от 8 до 40 аминокислотных остатков) в таких образцах (рис. 3). После обработки протеазами спектры существенно менялись (см. рис. 3). В контроле и при пепсинизации пептиды состояли из 12-40 аминокислотных остатков, при воздействии трипсином формировался пул пиков, соответствующих более низким массам, в основном в зоне 1500-3000 m/z (12-24 аминокислотных остатка) (табл. 1).

1. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) коротких пептидов (m/z 1500-5000) **после обработки мясного сырья животными протеазами**

Номер в Protein Database NCBI	S/M/C	m/z (позиция в последовательности АК)	Аминокислотная последовательность идентифицированных пептидов/белков
		Говядина (пепсин)	
		Пептиды миоглобина (ген MB)	
NP 776306.1	144/7/100	1853,8 (139-154)	FRNDMAAQYKVLGFHG
		3077,4 (2-30)	GLSDGEWQLVLNAWGKVEADVAGHGQEVL
		4157,8 (71-107)	TALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEF
		Пептиды фруктозо-бисфосфат альдолазы А (ген ALDOA)	
NP 001095385.1	92/4/26	4665,5 (31-70)	IRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASEDLKKHGNTVL
		3322,8 (2-2)1	PHQYPALTPEQKKELCDIAH
		Говядина (трипсин)	
		Пептиды фруктозо-бисфосфат альдолазы А (ген ALDOA)	
NP 001095385.1	86/6/30	3322,8 (2-21)	PHQYPALTPEQKKELCDIAH
		Свинина (пепсин)	
		Пептиды цепи А L-лактат дегидрогеназы (LDHA)	
NP 001165834.1	124/7/25	1940,9 (92-109)	VVITAGARQQEGESRLNL
		Свинина трипсин	
		Пептид кальсеквестрина-1 (CASQ1)	
Q05JF3	58/2/51	1952,9 (35-47)	EEGLDFPEYDGVD

Примечание. АК — аминокислоты. S/M/C: **S**core (показатель соответствия), **M**atch peptides (число совпадающих пептидов), **C**overage, % (покрытие полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами).

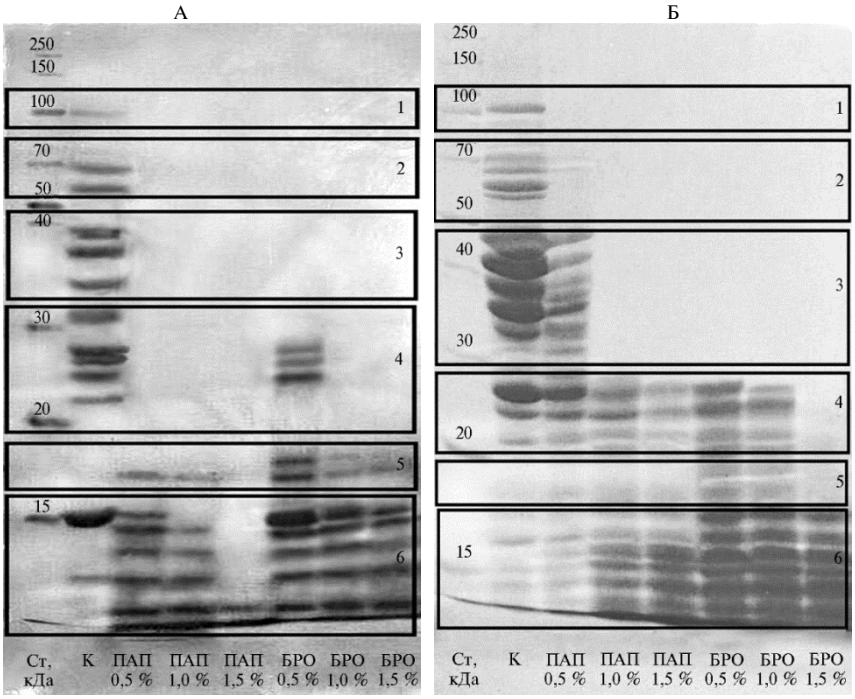


Рис. 4. Одномерный электрофорез скелетной мышцы крупного рогатого скота *Bos taurus* (тазобедренная часть) (А) **и свиньи *Sus scrofa* (карбонат)** (Б) **при обработке образцов ферментами растительного происхождения:** Ст — белковый маркер, К — контроль, ПАП — папаин, БРО — бромелайн; 0,5 %, 1,5 %, 2,5 % — концентрации ферментов.

А: 1 — α-актинин (103-104 кДа); 2 — эластин (64-66 кДа), десмин (53-55 кДа); 3 — альдолаза А (39,5 кДа), тропонин-Т скелетно-мышечный быстрого типа (35-38 кДа), β-

тропомиозин (32,5-32,7 кДа); 4 — тропонин-Т скелетно-мышечный медленного типа (28,6-32 кДа), тропонин-1 (23-25 кДа), кофилин (21-22,5 кДа), легкие цепи миозина-А1 (20,7 кДа); 5 — тропонин С (20 кДа), легкие цепи миозина-2 (18 кДа), миоглобин (17 кДа); 6 — скелемин (15 кДа), белок, связывающий жирные кислоты (14-15 кДа), фрагменты миоглобина (8-12 кДа).

Б: 1 — α-актинин (100кДа), мышечная креатинкиназа (80 кДа); 2 — миоальбумин (70 кДа), эластин (64-66 кДа), каталаза (58 кДа), β-тубулин (55 кДа); 3 — G-актин (42 кДа), мышечная альдолаза (40 кДа), тропомиозин-1 (39 кДа), тропонин-Т (35-38 кДа), тропомиозин-2 (32 кДа); 4 — легкие цепи миозина-1 (16-27 кДа), тропонин-1 (23-25 кДа), легкие цепи миозина-А1 (20,7 кДа); 5 — тропонин С (20 кДа), легкие цепи миозина-2 (18 кДа), миоглобин (17 кДа), скелемин (15 кДа); 6 — белок, связывающий жирные кислоты (14-15 кДа), фрагменты миоглобина (8-12 кДа).

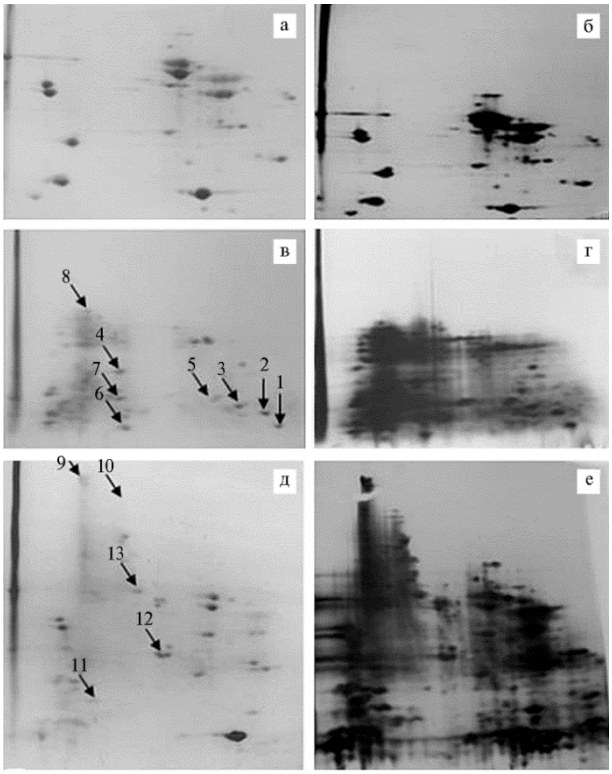


Рис. 5. Двумерный электрофорез белков скелетной мышцы крупного рогатого скота *Bos taurus* (тазобедренная часть) при обработке образцов ферментами растительного происхождения: а, б — контроль; в, г — обработка 0,5 % папаином; д, е — обработка 0,5 % бромелайном; слева — окрашивание Кумасси R-250, справа — азотнокислым серебром. Стрелками отмечены: 1, 2, 3 — фрагменты миоглобина (продукт гена *MB*), 4 — смесь фрагментов актина (*ACTG2*) и миозина 1 (*MYH1*), 5 — канонический миоглобин (*MB*), 6 — фрагмент актина (*ACTA1*), 7 — фрагмент миозина 7 (*MYH7*), 8, 9, 10 — фрагмент миозина 2 (*MYH2*), 11 — скелетно-мышечная легкая цепь миозина 1/3 (*MYL1*), 12 — фрагмент миозина 1 (*MYH1*), 13 — смесь фрагментов миозина 2 (*MYH2*) и миозина 1 (*MYH1*).

В свинине под действием растительных ферментов (рис. 4, Б) происходила значительная деструкция белков с молекулярными массами выше 50 кДа (с папаином) и выше 30 кДа (с бромелайном). Интенсивно накапливались белковые фрагменты менее 20 кДа, особенно в образцах с бромелайном. По действию растительные протеазы заметно отличались от животных, вероятно, из-за гораздо меньшей специфичности по отношению к потенциально атакуемым белкам.

Белковый профиль КРС (рис. 5) подвергся значительной деструкции: практически все белки с массой более 20 кДа оказались разрушены. Происходило значительное накопление белковых фрагментов в диапазоне масс ниже 20 кДа. При этом папаин воздействовал более эффективно.

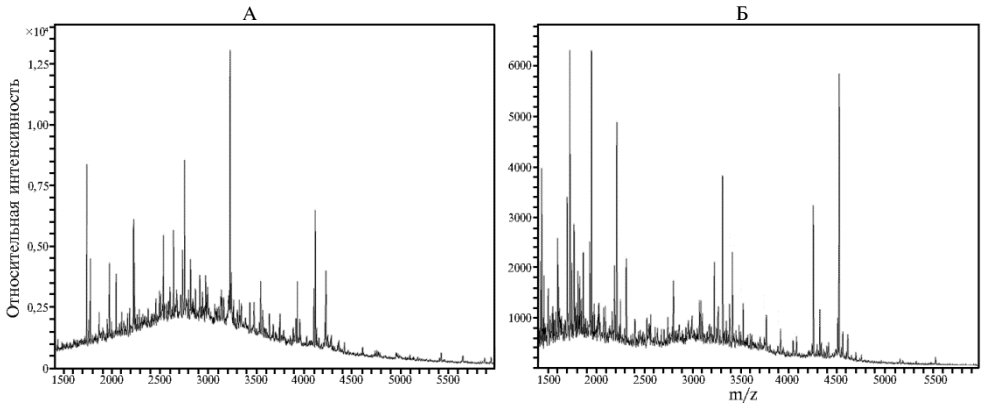
При обработке говядины бромелайном в остаточном количестве детектировались фракции α- и β-тропомиозинов и практически интактным оставался миоглобин. При воздействии папаина сохранялся высокий фон окрашивания геля за счет появления гетерогенной смеси высокомолекулярных фрагментов (15-60 кДа). При обработке папаином детектировались фрагменты разных типов тяжелых цепей (MYH1, MYH2 и MYH7) миозина, локализованные в мышечных волокнах быстрого и медленного типа. Действие бромелайна оказалось более специфичным для волокон быстрого типа (фракций фрагментов MYH7 не обнаружили). Число полос при одномерном гель-электро-

форезе значительно менялось при обработке свинины и говядины растительными ферментами (табл. 2).

2. Число белковых полос на одномерных электрофореграммах при обработке образцов ткани скелетной мышцы крупного рогатого скота *Bos taurus* (тазобедренная часть) и свиньи *Sus scrofa* (карбонат) ферментами растительного происхождения в разной концентрации

Молекулярная масса, кДа	Контроль 1	Пепсин, %			Трипсин, %			Контроль 2	Бромелайн, %			Папаин, %		
		0,5	1,5	2,5	0,5	1,5	2,5		0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
Говядина														
> 250	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
150-250	1	1	1	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–
100-149	1	1	1	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–
70-99	–	1	1	1	1	1	1	4	–	–	–	–	–	–
50-69	2	2	2	2	2	2	2	3	–	–	–	2	–	–
37-49	3	3	3	3	3	3	3	3	–	–	–	5	–	–
25-37	6	6	6	6	6	6	6	4	1	1	–	4	2	1
20-24	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2
15-20	–	–	–	–	–	–	–	4	6	6	4	5	5	5
10-15	2	4	4	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2
Свинина														
> 250	1	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–
150-250	1	1	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–
100-149	1	1	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–
70-99	2	2	2	2	2	2	2	2	–	–	–	–	–	–
50-69	3	3	3	3	3	3	3	1	–	–	–	–	–	–
37-49	3	3	3	3	3	3	3	2	–	–	–	–	–	–
25-37	6	6	6	6	6	6	6	5	3	–	–	–	–	–
20-24	2	2	2	2	2	2	2	2	–	–	–	–	–	–
15-20	3	2	2	1	1	–	–	1	3	3	3	2	1	–
10-15	4	4	4	4	3	3	3	1	4	4	4	4	4	1

Примечание. Контроли 1 и 2 — неферментированное исходное сырье (соответственно для варианта с животными и растительными ферментами). Прочерки означают, что в указанном диапазоне молекулярных масс отсутствуют белковые фракции, в которых произошли явные изменения.



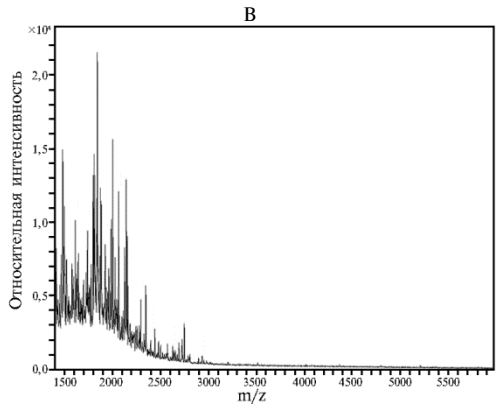


Рис. 6. Спектры масс пептидов скелетной мышцы крупного рогатого скота *Bos taurus* (тазобедренная часть) при обработке ферментами растительного происхождения: А — контроль, Б — 0,5 % папаин, В — 0,5 % бромелайн. Идентифицирован пептид актина с m/z 2066,0 фрагмента а.о. 244-257 (I/LPDGQVI/LNERF).

При исследовании спектра коротких пептидов (рис. 6) в экстрактах, обработанных растительными протеазами, выявили появление дополнительных пиков. При обработке папаином детектировались пептиды с m/z до 4500, бромелайном — не более 3000 (в основном до

2500). Мы построили аминокислотную последовательность пептида, относящегося к семейству актинов *Bos taurus* (без дополнительной детализации и привязки к гену), при обработке говядины бромелайном. Пептид был консервативен для актинов и соответствовал позициям 244-257 а.о. в молекуле канонического скелетномышечного актина *Bos taurus* (ген *ACTA1*), m/z позиция 2066,0 (I/LPDGQVI/LTI/LNERF). Очевидно, что идентификация коротких пептидов в этом случае должна проводиться с использованием многомерной хроматографии, более адаптированной для работы с короткими пептидами.

Полученные нами данные согласуются с результатами других исследований. Известно, что пептиды с биологической активностью естественным образом образуются у млекопитающих в желудочно-кишечном тракте во время метаболизма белков мясного рациона под воздействием пищеварительных ферментов, секретируемых в тонкой кишке (35-38). Чтобы генерировать подобные потенциально функциональные пептиды, имитируют процесс желудочно-кишечное пищеварение с использованием коммерческих экзогенных протеиназ, полученных из тканей животных (пепсин и трипсин), растений (папаин, фицин и бромелайн) и микробных источников (алкалаза®, флавурзим®, нейтраза®, коллагеназа или протеиназа K) (37, 39, 40). Кроме мясного сырья, для получения некоторых биологически активных пептидов проводят ферментативный гидролиз коллагена из мяса или побочных продуктов убоя (обрези, органов, гемоглобина) (41). T. Lafarga с соавт. (42) изучили высвобождение потенциальных биологически активных пептидов — ангиотензин-I-превращающего фермента (ACE-I, EC 3.4.15.1), ренина (EC 3.4.23.15) и дипептидилпептидазы IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) из бычьих и свиных белков, включая гемоглобин, коллаген и сывороточный альбумин. Эти белки обычно встречаются в мясных субпродуктах (кости, кровь и мясная обрезь) и играют ключевые роли в контроле гипертонии и развитии сахарного диабета 2-го типа и других заболеваний, связанных с метаболическим синдромом. Новые пептиды включали ингибирующий ACE-I трипептид Ile-Ile-Tyr и ингибирующий DPP-IV трипептид Pro-Pro-Leu, соответствующие последовательностям f (позиции 182-184-я) и f (позиции 326-328-я) свиного и бычьего сывороточного альбумина, которые могут высвобождаться после гидролиза соответственно папаином и пепсином. В других исследованиях (43) определяли ингибирующую и антиоксидантную активность ангиотензин-I-превращающего фермента (АПФ-I) саркоплазматических белков, выделенных из грудной мышцы (Pectoralis profundus) крупного рогатого скота (*Bos taurus*) и гидролизованных папаином. Саркоплазматические белковые гидролизаты подвергали мембранной ультрафильтрации и получали фильтраты 10 кДа и 3 кДа. В результате 11 пептидов были охарактеризованы из общей фракции гидролизатов, 15 — из фракций фильтрата 10 кДа, 9 пептидов — из фракций фильтрата 3 кДа. Авторы выявили сходство между аминокислотными последовательностями идентифицированных ими пептидов и известных антиоксидантных и ингибирующих ACE-I пептидов, описанных в базе данных BIOPEP. Как перспективные источники биологически активных пептидов изучались свиные миофибриллярные белки (44). После симуляции процесса желудочно-кишечного пищеварения (с использованием пепсина, трипсина и химотрипсина) определенных миофибриллярных белков свиней среди интактных белков наиболее часто обнаруживались пептидные последовательности, ингибирующие дипептидилпептидазу IV. Всего же обнаружено в общей сложности 399 пептидов с разными активностями (ингибирование

ферментов, антиоксидантная, гипотензивная, стимулирующая, антиамнестическая активность, регуляция функций организма).

Таким образом, мы выявили количественное уменьшение компонентов в белковом профиле говядины и свинины под действием протеаз различного происхождения. Животные протеазы действовали на сырье более равномерно и специфично, чем растительные. Для растительных протеаз характерно образование промежуточных фрагментов, что не наблюдалось в образцах с животными протеазами. Во всех случаях обнаруживались новые фрагменты белков, в том числе низкомолекулярных, что подтвердила масс-спектрометрия. С помощью тандемной масс-спектрометрии идентифицированы некоторые фрагменты, предположительно обладающие биологически активными свойствами. Наибольшие изменения в белковом профиле мясного сырья проявлялись при его обработке протеазами растительного происхождения, следовательно, в этом случае можно ожидать образования биологически активных пептидов.

[1]ФГБНУ ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,
109316 Россия, г. Москва, ул. Талалихина, 26,
e-mail: imcher@inbox.ru, natali-mng@yandex.ru ✉, n.vostrikova@@fncps.ru;
[2]Институт биохимии им. А.Н. Баха ФГУ ФИЦ Биотехнологии РАН,
119071 Россия, г. Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2,
e-mail: kovalyov@inbi.ras.ru, m1968@mail.ru;
[3]ФГБОУ ВО Московский государственный университет пищевых производств,
125080 Россия, г. Москва, Волоколамское ш., 11,
e-mail: dmitr.afanasjew2010@yandex.ru, olgabaj74@mail.ru

Поступила в редакцию 10 апреля 2018 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2018, V. 53, № 6, pp. 1247-1261

GENERATION OF BIOACTIVE PEPTIDES IN MEAT RAW MATERIALS EXPOSED TO PROTEASES OF DIFFERENT ORIGIN

I.M. Chernukha[1], N.G. Mashentseva[1], N.L. Vostrikova[1], L.I. Kovalev[2], M.A. Kovaleva[2], D.A. Afanasev[3], A.A. Bazhaev[3]

[1]Gorbatov Federal Center for Food Systems RAS, 26, ul. Talalikhina, Moscow, 109316 Russia, e-mail imcher@inbox.ru, natali-mng@yandex.ru (✉ corresponding author), n.vostrikova@@fncps.ru;
[2]Federal Research Center for Biotechnology, Bakh Institute of Biochemistry RAS, 33/2, Leninskii prosp., Moscow, 119071 Russia, e-mail kovalyov@inbi.ras.ru, m1968@mail.ru;
[3]Moscow State University of Food Industry, 11, Volokolamskoe sh., Moscow, 125080 Russia, e-mail dmitr.afanasjew2010@yandex.ru, olgabaj74@mail.ru
ORCID:
Chernukha I.M. orcid.org/0000-0003-4298-0927
Mashentseva N.G. orcid.org/0000-0002-9287-0585
Vostrikova N.L. orcid.org/0000-0002-9395-705X
Kovalev L.I. orcid.org/0000-0001-6519-8247
Kovaleva M.A. orcid.org/0000-0002-3486-2122
Afanasev D.A. orcid.org/0000-0002-7463-4503
Bazhaev A.A. orcid.org/0000-0001-6152-6389
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially by the grant of the Russian Scientific Foundation (project No. 16-16-10073)
Received April 10, 2018 doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1247eng

Abstract

There are plenty of methods nowadays used for the technological correction of meat raw materials and increasing the functionality of meat products. Among them, the enzymatic hydrolyses using proteases of microbial, plant or animal origin causes considerable interest. Sarcoplasmic and myofibrillar proteins of meat products are subjected to proteolysis during enzymatic treatment, resulting in the peptides generation, including those with high physiological activity and a pronounced therapeutic and preventive effect. Usually they are low molecular weight compounds consisting of several amino acid residues. It should be noted that, unlike drugs, such peptides are able to rapidly penetrate the gastrointestinal tract membranes and further into the bloodstream and the rest of the organism. The aim of this work was to study the bioactive peptides generation

in various meat raw materials due to enzymatic hydrolyses by enzymes of animal (pepsin, trypsin) and plant (papain, bromelain) origin. *Bos taurus* and *Sus scrofa* skeletal muscle samples were injected with 5 ml of proteases in 50 g of raw meat. The samples were kept for 40 min at 30 °C for exposure to trypsin and pepsin solutions, 30 min at 30 °C for papain and bromelain. The optimum pH value was not established for the enzymes in the samples, the fermentation process was carried out at the native pH of the raw meat. Humidity in the room was 50-55 %. As a control, the corresponding muscle samples without enzymatic treatment were used. According to the results of a one-dimensional gel electrophoresis under denaturing conditions using sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), obvious quantitative differences were found in the protein profiles of the studied raw materials, and different profiles were obtained for proteases of different origin. A subsequent two-dimensional isoelectric focusing electrophoresis in an ampholine pH gradient (IEF-PAGE) confirmed the obtained results and revealed the used proteases features. Thus, animal proteases, possessing high specificity, affect only a certain part of muscle proteins, but almost entirely destruct them to small peptides (including low molecular weight) and free amino acids. In addition, a greater proteolytic activity of trypsin compared to pepsin was noted. Plant origin proteases affect the majority of muscle proteins with a sufficiently low specificity and destruct them to many fragments, as evidenced by the presence of numerous new protein fractions on 2D-electrophoregram. Using mass spectrometry (MALDI-TOF MS and MS/MS) some short peptides were detected and identified in samples treated with animal proteases. It was practically not possible to detect short peptides after plant proteases treatment due to the insufficient suitability of mass spectrometry to determine the very low molecular weight of generated peptides. Thus, plant origin proteases generate intermediate fractions of some muscle proteins and bioactive peptides more actively and efficiently. The raw materials processing by proteolytic enzymes, in our opinion, can be regarded as the most effective way to obtain biologically active peptides.

Keywords: proteolytic enzymes, enzymatic hydrolyses, biologically active peptides, one-dimensional gel electrophoresis, SDS-PAGE, two-dimensional electrophoresis, IEF-PAGE, MALDI-TOF, mass spectrometry identification.

REFERENCES

1. Warriss P.D. Optimal lairage times and conditions for slaughter pigs: a review. *Vet. Rec.*, 2003, 153(6): 170-176 (doi: 10.1136/vr.153.6.170).
2. Wendt M., Bickhardt K., Herzog A., Fisher A., Martens H., Richter T. Porcine stress syndrome and PSE meat: clinical symptoms, pathogenesis, etiology and animal rights aspects. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 2000, 113(5): 173-190.
3. Mitaseva L.F., Mashentseva N.G., Glazkova I.V., Stepanova E.V., Koroleva O.V., Nikolaev I.V.. *Myasnaya industriya*, 2009, 9: 66- 69 (in Russ.).
4. Bouglé D., Bouhallab S. Dietary bioactive peptides: human studies. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 2017, 57(2): 335-343 (doi: 10.1080/10408398.2013.873766).
5. de Almeida M.A., Saldaca E., da Silva Pinto J.S., Palacios J., Contreras-Castillo C.J., Sentandreu M.A., Fadda S.G. A peptidomic approach of meat protein degradation in a low-sodium fermented sausage model using autochthonous starter cultures. *Food Res. Int.*, 2018, 109: 368-379 (doi: 10.1016/j.foodres.2018.04.042).
6. Korhonen H., Pihlanto A. A food-derived bioactive peptides — opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.*, 2003, 9: 1297-1308 (doi: 10.2174/1381612033454892).
7. Lafarga T., Hayes M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Sci.*, 2014, 98: 227-239 (doi: 10.1016/j.meatsci.2014.05.036).
8. Ryan J.T., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.F., Stanton C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fi sh. *Nutrients*, 2011, 3: 765-791 (doi: 10.3390/nu3090765).
9. Udenigwe Ch.C., Howard A. Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Res. Int.*, 2013, 54: 1021-1032 (doi: 10.1016/j.foodres.2012.10.002).
10. Ockerman HW., Basu L. Fermented meat products: production and consumption. In: *Handbook of fermented meat and poultry. Chapter 2* /F. Toldrá (ed.). Iowa, Blackwell Publishing, 2008: 7-9.
11. Fadda S., Sanz Y., Vignolo G., Aristoy M.C., Oliver G., Toldra F. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum. Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(8): 3540-3546.
12. Fadda S., Sanz Y., Vignolo G., Aristoy M.-C., Oliver G., Toldra F. hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake. Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(2): 578-584.
13. Sanz Y., Fadda S., Vignolo G., Aristoy M.-C., Oliver G., Toldra F. Hydrolytic action of *Lactobacillus casei* CRL 705 on pork muscle sarcoplasmic and myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47: 3441-3448 (doi: 10.1021/jf981255n).
14. Hayes M., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotechnol. J.*,

2007, 2: 435-449 (doi: 10.1002/biot.200700045).
15. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.*, 2006, 16: 945-960 (doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012).
16. Möller N.P., Scholz-Ahrens K.E., Roos N., Schrezenmeir J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Nutr.*, 2008, 47: 171-182 (doi: 10.1007/s00394-008-0710-2).
17. Arihara K. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Sci.*, 2006, 74: 219-229 (doi: 10.1016/j.meatsci.2006.04.028).
18. Ferranti P., Nitride Ch., Nicolai M.A., Babini E., Marcolini E., Capozzi F. In vitro digestion of Bresaola proteins and release of potential bioactive peptides. *Food Res. Int.*, 2014, 63: 157-169 (doi: 10.1016/j.foodres.2014.02.008).
19. Li Y., Yu J. Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *J. Med. Food*, 2014, 18: 147-156 (doi: 10.1089/jmf.2014.0028).
20. Hartmann R., Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, 18: 163-169.
21. Katayama K., Mori T., Kawahara S., Miake K., Kodama Y., Sugiyama M., Kawamura Y., Nakayama T., Maruyama M., Muguruma M. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine skeletal muscle myosin and its antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *J. Food Sci.*, 2007, 72: 702-706 (doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00571.x).
22. Muguruma M., Ahhmed A.M., Katayama K., Kawahara S., Maruyam M., Nakamura T. Identification of pro-drug type ACE inhibitory peptide sourced from porcine myosin B: Evaluation of its antihypertensive effects in vivo. *Food Chem.*, 2009, 114: 516-522 (doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.081).
23. Katayama K., Tomatsu M., Fuchu H., Sugiyama M., Kawahara S., Yamauchi K., Kawamura Y., Muguruma M. Purification and characterization of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Anim. Sci. J.*, 2003, 74: 53-58 (doi: 10.1046/j.1344-3941.2003.00086.x).
24. Katayama K., Anggraeni H.E., Mori T., Ahhmed A.M., Kawahara S., Sugiyama M., Nakayama T., Maruyama M., Muguruma M. Porcine skeletal muscle troponin is a good source of peptides with angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56: 355-360 (doi: 10.1021/jf071408j).
25. Katsaros G.I., Katapodis P., Taoukis P.S. High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering*, 2009, 1(91): 42-48 (doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.08.002).
26. Schmidt H. Effect of papain on different phases of prenatal ontogenesis in rats. *Reproductive Toxicology*, 1995, 1(9): 49-55.
27. Herranz B., Fernandez M., Hierro E., Bruna J.M., Ordonez J.A., De la Hoz L. Use of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763 and α-ketoglutarate to improve the sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Sci.*, 2004, 1(66): 151-163 (doi: 10.1016/S0309-1740(03)00079-2).
28. Shimizu M., Sawashita N., Morimatsu F., Ichikawa J., Taguchi Y., Ijiri Y., Yamamoto J. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis Research*, 2009, 5(123): 753-757 (doi: 10.1016/j.thromres.2008.07.005).
29. Melendo J.A., Beltran J.A., Jaime I., Sancho R., Roncales P. Limited proteolysis of myofibrillar proteins by bromelain decreases toughness of coarse dry sausage. *Food Chem.*, 1996, 3(57): 429-433 (doi: 10.1016/0308-8146(95)00247-2).
30. Zhao G.Y., Zhou M.Y., Zhao H.L., Chen X.L., Xie B.B., Zhang X.Y., He H.L., Zhou B.C., Zhang Y.Z. Tenderization effect of cold-adapted collagenolytic protease MCP-01 on beef meat at low temperature and its mechanism. *Food Chem.*, 2012, 134(4): 1738-1744 (doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.118).
31. Osterman L.A. *Metody issledovaniya belkov i nukleinovykh kislot: elektroforez i ul'tratsentrifugirovanie (prakticheskoe posobie)* [Methods for the study of proteins and nucleic acids: electrophoresis and ultracentrifugation (practical guide)]. Moscow, 1981 (in Russ.).
32. Kovalev L.I., Shishkin S.S., Kovaleva M.A., Ivanov A.V., Vostrikova N.L., Chernukha I.M. *Vse o myase*, 2013, 3: 32-34 (in Russ.).
33. Kovalyov L.I., Kovalyova M.A., Kovalyov P.L., Serebryakova M., Moshkovskii S.A., Shishkin S.S. Polymorphism of delta3,5-delta2,4-dienoyl-coenzyme A isomerase (the ECH1 gene product protein) in human striated muscle tissue. *Biochemistry (Moscow)*, 2006, 71(4): 448-453.
34. 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. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. *Meat Sci.*, 2015, 105: 46-52 (doi: 10.1016/j.meatsci.2015.03.001).
35. Bauchart C., Morzel M., Chambon C., Mirand P.P., Reynès C., Buffère C., Rémond D. Peptides reproducibly released by in vivo digestion of beef meat and trout flesh in pigs. *Br. J. Nutr.*, 2007, 98(6): 1187-1195 (doi: 10.1017/S0007114507761810).
36. Adje E., Balti R., Kouach M., Guillochon D., Nedjar-Arroume N. 67-106 of bovine hemoglo-

bin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Eur. Food Res. Technol.*, 2011, 232: 637-646 (doi: 10.1007/s00217-011-1430-z).
37. Pihlanto A., Korhonen H. Bioactive peptides and proteins. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2003, 47: 175-276 (doi: 10.1016/S1043-4526(03)47004-6).
38. Albenzio M, Santillo A, Caroprese M, Della Malva A, Marino R. Bioactive peptides in animal food products. *Foods*, 2017, 6(5): E35 (doi: 10.3390/foods6050035).
39. Lafarga T., O'Connor P., Hayes M. In silico methods to identify meat-derived prolyl endopeptidase inhibitors. *Food Chem.*, 2015, 175: 337-343 (doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.150).
40. Cheung I.W.Y., Nakayama S., Hsu M.N.K., Samaranayaka A.G.P., Li-Chan E.C.Y. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from Oat (*Avena sativa*) proteins by in silico and in vitro analyses. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57: 9234-9242 (doi: 10.1021/jf9018245).
41. Vercruysse L., Van Camp J., Smagghe G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysate of animal protein: a review. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53: 8106-8115 (doi: 10.1021/jf0508908).
42. Lafarga T., O'Connor P., Hayes M. Identification of novel dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using in silico analysis. *Peptides*, 2014, 59: 53-62 (doi: 10.1016/j.peptides.2014.07.005).
43. Di Bernardini R., Mullen A.M., Bolton D., Kerry J., O'Neill E., Hayes M. Assessment of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmic proteins produced by papain and characterisation of associated bioactive peptidic fractions. *Meat Sci.*, 2012, 90(1): 226-235 (doi: 10.1016/j.meatsci.2011.07.008).
44. Kęska P., Stadnik J. Porcine myofibrillar proteins as potential precursors of bioactive peptides - an in silico study. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2016, 23(24): 24901-24911 (doi: 10.1039/c5fo01631b).