

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ МЫШЦ ЯПОНСКИХ ПЕРЕПЕЛОВ (*COTURNIX JAPONICA*) ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ФИТАЗ ГРИБНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

**Е.П. Исакова, Н.Н. Гесслер, О.И. Кляйн, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева,
Ю.И. Дерябина, А.В. Розумий**

Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия

Птица является важным источником животного белка, на долю которой приходится 30 % мирового потребления мяса [1]. По сравнению с говядиной и свининой мясо птицы содержит меньше жира, натрия и холестерина и обладает высоким уровнем ненасыщенных жирных кислот [2, 3]. При применении современных технологий разведения основные биологические характеристики мясных цыплят, т. е. продуктивность грудных мышц, состав тела, суточные прирост веса, эффективность конверсии корма и устойчивость к болезни, значительно улучшились [4, 5]. И важным аспектом, позволяющим повышать эффективность производства мяса птицы является соблюдение технологии выращивания мясных цыплят и их откорма, в частности, оптимальный срок откорма птицы и эффективный состав кормовых смесей. Использование сырых ферментных продуктов в качестве добавок к кормам привлекло значительное внимание производителей кормов и животноводов как средство улучшения продуктивности животных [6]. Добавление экзогенных ферментов в рацион для улучшения продуктивности домашней птицы является одной из важнейших мер оптимизации производства и включает биодобавки на основе мультиферментов, разлагающих некрахмальные полисахариды [7], пробиотиков [8] и фитазных комплексов [9].

Однако, механизмы влияния фитазных препаратов на качество мяса домашней птицы и белковый состав мышц до сих пор не изучены. В работе [10] был опубликован транскриптомный анализ мышечной ткани бройлеров (*Gallus gallus*), получающих бактериальную фитазу из *Citrobacter braakii* (DSM Nutritional Products Ltd, Kaiseraugst, Switzerland) в дозе 1000 единиц на 1 кг веса птицы. Проведенные исследования выявили, что некоторые дифференциально экспрессируемые гены у птиц, получающих фитазу, по сравнению с животными, которые получали диету с пониженным содержанием фосфора без фитазы, наблюдалась значительная активация метаболических путей, связанных с мышечным метаболизмом.

В этой связи следует отметить, что протеомные методы могут стать эффективным инструментом для определения молекулярной основы физиологических изменений в мышцах во время роста птицы и помочь в выяснении механизма действия фитазных препаратов на уровне метаболизма мышечной ткани. Целью представленной работы является анализ влияния биологической добавки на основе бактериальной фитазы из *Obesumbacterium proteus*, инкапсулированной в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* Polf pUV3-Op, и коммерческой грибной фитазы *Ladozym proxy* из *Aspergillus ficuum* на белковый состав мяса японских перепелов (*Coturnix japonica*) с применением методов протеомного анализа. В исследовании изменения протеома определялись в грудных (pectoralis) и ножных (femoralis) мышцах перепелов, получающих фитазные препараты бактериального и грибного происхождения, чтобы лучше понять механизмы, лежащие в основе изменения характеристик тушек птицы и качества мяса, вызванного их добавлением в рацион.

Исследования проводились во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте птицеводства РАН (ВНИТИП РАН) с использованием породы маньчжурских золотистых перепелов (*Coturnix japonica*), занесенной в Международный регистр пород и линий перепелов. Это очень продуктивная порода с хорошей яйценоскостью и достаточно крупным размером яиц. В опытах самцов и самок выращивали в общих клеточных батареях для молодняка до 42 дней. 42-дневных перепелов разделяли на самцов и самок и переводили в клеточные батареи для взрослой птицы, где они содержались до 60-дневного возраста в соотношении полов 1:4 (самец: самка). Влажность воздуха поддерживали на уровне 65 ± 5 % в течение всего эксперимента, а температура в помещении варьировалась: первую неделю она составляла 30 °С, вторую – 28 °С, третью – снижалась до 26–25 °С, четвертую и последующие – 23–22 °С. Протокол эксперимента был одобрен на заседании Локального этического комитета ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (протокол № 22/1 от 09.07.2022).

В ходе эксперимента было сформировано шесть групп суточных перепелов по 25 голов в каждой, различающихся по видам корма:

Контрольная группа 1 получала корм с общим фосфором 0,8 % (0,45 % доступного фосфора) без каких-либо добавок;

Контрольная группа 2 получала корм с общим фосфором 0,6 % (0,35 % доступного фосфора) без каких-либо добавок;

Экспериментальная группа 3 получала корм с общим фосфором 0,6 % (0,35 % доступного фосфора) с добавлением микрокапсулированной фитазы *O. proteus* в дозе 500 FYT на кг корма;

Экспериментальная группа 4 получала корм с общим фосфором 0,8 % (0,45 % доступного фосфора) с добавлением микрокапсулированной фитазы *O. proteus* в дозе 500 FYT на кг корма;

Экспериментальная группа 5 получала корм с содержанием общего фосфора 0,8 % (0,45 % доступного фосфора) с добавлением коммерческой фитазы *Ladozym proxu* из *A. ficuum* в дозе 4500 FYT на кг корма;

Экспериментальная группа 6 получала корм с содержанием общего фосфора 0,6 % (0,35 % доступного фосфора) с добавлением коммерческой фитазы *Ladozym proxu* из *A. ficuum* в дозе 4500 FYT на кг корма.

Приготовление биодобавок осуществляли, как описано в [11]. Для определения качества мяса и анализа протеома был произведен убой перепелов в возрасте 42 суток. Была проведена анатомическая разделка птицы, при которой были собраны образцы мышц. Приготовление белковых экстрактов, их фракционирование методом двумерного электрофореза по О'Фарреллу (2DE) с собственными модификациями и анализ электрофореграмм проводили, как описано ранее [12–14]. Фракции, выбранные для идентификации, были вырезаны из гелей 2DE, а белки были гидролизованы трипсином. Извлечённые пептиды были проанализированы с помощью MALDI-TOF MS, как описано ранее с некоторыми модификациями [15]. Для анализа белок-белковых взаимодействий дифференциально экспрессируемые белки анализировали в базе данных STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Protein, <http://string-db.org/>) с наивысшей оценкой достоверности (score > 0,9).

Далее были проведены сравнительные исследования профиля белков мышечной ткани грудных и ножных мышц перепелов. Экстракты образцов тканей были разделены методом двумерного электрофореза белков по О'Фарреллу, а затем пятна, интенсивность которых значительно различалась в различных условиях, были идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии для определения дифференциально экспрессирующихся белков. Всего был идентифицирован 31 белок, содержание которых в разных условиях заметно различалось. Наборы белков, характерных для мышц различных групп животных, были сопоставлены между собой. При протеомном исследовании мышечной ткани перепелов – ткани грудки (маховые мышцы) и бедра (скелетные мышцы) был выявлен ряд различий в белковом составе этих типов мышц. Основные различия были идентифицированы в семействе тропомиозинов. В ткани ножных мышц они были представлены в виде продуктов двух генов: TPM1 (α -1 тропомиозин) и TPM2 (β -тропомиозин), а в ткани грудки присутствовала только фракция α -1 тропомиозина. Фракция мышечной креатинфосфокиназы (СКМ) (Гомолог Creatine kinase M – type *** (3)) была представлена в скелетной мышце в большем количестве, и возможно, что в виде двух изоформ, одна из которых была пострансляционно модифицирована.

Кроме специфичности белкового состава разных типов мышц также оценивалось влияние разных условий откорма на белковый состав мышечной ткани, где были выявлены определенные различия. Результаты исследований показали, что оба препарата фитазы обеспечивали некоторые изменения в протеомных профилях мышц и увеличивали общее количество белка. Однако инкапсулированная фитаза из *O. proteus* действовала более эффективно при нормальных уровнях доступного фосфора, чем грибная фитаза из *A. ficuum*. Она обеспечивала сопутствующее увеличение белков семейства тропомиозинов и значительное изменение сократительной способности скелетных мышц. Также для всех групп, использующих фитазы в рационе, мы впервые продемонстрировали ацетилирование N-концевой части молекулы для четырех белков перепелов, а именно парвальбумина альфа изоформы X2 (PVALB), цепи L-лактатдегидрогеназы A (LDHA), фрагмента PDZ и LIM домена белка 5 изоформы X9 (LOC107313615), что может быть связано с изменениями в формировании сократительного

аппарата мышц и перераспределением метаболитов между аэробными и анаэробными метаболическими путями.

Таким образом, мы впервые провели исследование изменения протеомных профилей мышечной ткани перепелов при внесении в их рацион добавок фитазных препаратов. Мы показали, что добавление фитаз существенным образом изменяет экспрессию мышечных белков, и этот эффект зависит от уровня доступного фосфора. Оба фитазных препарата обеспечивают изменение гистологической картины мышечной ткани и увеличение белкового компонента в составе мышц. Однако, инкапсулированная форма бактериальной фитазы при нормальном уровне доступного фосфора работает более эффективно, чем грибная фитаза, обеспечивая перестройку состава белков сократительного ряда, а также впервые продемонстрировали ацетилирование / деацетилирование некоторых ферментов, связанных с гликогенолизом / гликолизом, что в совокупности может влиять на качество мяса птицы.

Работа поддержана Российским научным фондом, соглашение № 22-16-00093 от 12 мая 2022 года.

Литература

1. Seal BS, Lillehoj HS, Donovan DM, Gay CG: Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Anim Health Res Rev* 2013, 14:78–87
2. Ponte PI, Prates JA, Crespo JP, Crespo DG, Mourao JL, Alves SP, Bessa RJ, Chaveiro-Soares MA, Ferreira LM, Fontes CM: Improving the lipid nutritive value of poultry meat through the incorporation of a dehydrated leguminous-based forage in the diet for broiler chicks. *Poult Sci* 2008, 87:1587–1594;
3. Givens I: Animal nutrition and lipids in animal products and their contribution to human intake and health. *Nutrients* 2009, 1:71–82.
4. Havenstein G, Ferket P, Qureshi M: Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci* 2003, 82:1500–1508;
5. Havenstein G, Ferket P, Qureshi M: Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci* 2003, 82:1509–1518
6. Marquardt RR, Brenes A, Zhang Z, Boros D (1996). Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 60: 321–330.
7. Shehab A.E., Kamelia M.Z., Khedr N.E., Tahia E.A. and Esmail F.A. Effect of Dietary Enzyme Supplementation on Some Biochemical and Hematological Parameters of Japanese Quails. *J Anim Sci Adv* 2012, 2(9): 734–739
8. Zheng A, Luo J, Meng K, Li J, Zhang S, Li K, Liu G, Cai H, Bryden WL, Yao B. Proteome changes underpin improved meat quality and yield of chickens (*Gallus gallus*) fed the probiotic *Enterococcus faecium*. *BMC Genomics*. 2014 Dec 23; 15(1) : 1167. doi: 10.1186/1471–2164–15–1167.
9. О. Труфанов. Фитаза в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы, Киев: ПолиграфИнко, 2011. – 112 с.
10. Schmeisser J, Séon AA, Aureli R, Friedel A, Guggenbuhl P, Duval S, et al. Exploratory transcriptomic analysis in muscle tissue of broilers fed a phytase-supplemented diet. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2017; 101(3) : 563–75. <https://doi.org/10.1111/jpn.12482>.
11. Danilova, M.A.; Epova, E.Y.; Trubnikova, E.V.; Badrutdinov, N.V.; Kokoreva, A.S.; Pusev, M.S.; Deryabina, Y.I.; Isakova, E.P. Encapsulated Phytase Produced by Recombinant *Yarrowia lipolytica* Exhibits High Efficiency on Broiler Chickens in Low Dosage. *Appl. Sci.* 2022, 12, 11999. <https://doi.org/10.3390/app122311999>
12. Kovalyov, L.I., Shishkin, S.S., Efimochkin, A.S., Kovalyova, M.A., Ershova, E.S., Egorov, T.A., Musalyamov, A.K. The major protein expression profile and two-dimensional protein database of human heart. *Electrophoresis* 1995, 16, 1160–1169;
13. Kovalyova, M.A.; Kovalyov, L.I.; Serebryakova, M.V. Age-Related Changes in Albumin and Actin of Human Myo-cardium. *Biochemistry (Moscow)* 2008, 2, 160–165.;
14. Epova, E.; Guseva, M.; Kovalyov, L.; Isakova, E.; Deryabina, I.Y.; Belyakova, A.; Zylkova, M.; Shevelev, M.Z.A.A. Identification of Proteins Involved in pH Adaptation in Extremophile Yeast *Yarrowia lipolytica*. In *Proteomic Applications in Biology*; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2012; pp. 209–224
15. Govorun, V.M.; Moshkovskii, S.A.; Tikhonova, O.V.; Goufman, E.I.; Serebryakova, M.V.; Momynaliev, K.T.; Lokhov, P.G.; Khryapova, E.V.; Kudryavtseva, L.V.; Smirnova, O.V. Comparative Analysis of Proteome Maps of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Biochemistry (Moscow)* 2003, 68, 42–49, doi : 10.1023/a : 1022189200944.